

**ANWENDUNG EINES DIODENARRAY-SPEKTROMETERS
ZUR ANALYSE CHROMATOGRAPHISCH
GETRENNTER PEPTIDE**

DISSERTATION

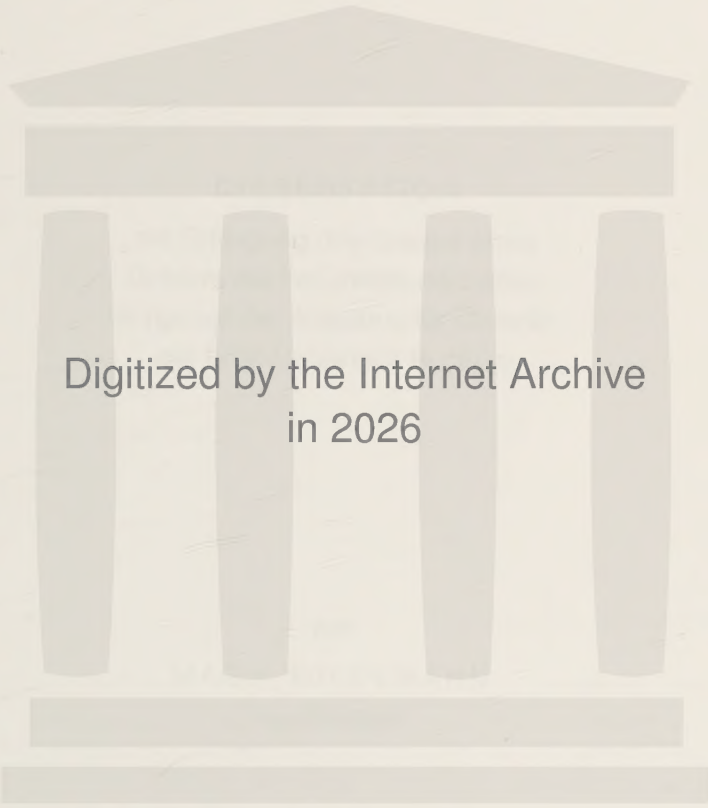
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
vorgelegt der Abteilung für Chemie
der Ruhr-Universität Bochum

von

MARIA WIEDEMANN
aus Bochum

Bochum 1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

**ANWENDUNG EINES DIODENARRAY-SPEKTROMETERS
ZUR ANALYSE CHROMATOGRAPHISCH
GETRENNTER PEPTIDE**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
vorgelegt der Abteilung für Chemie
der Ruhr-Universität Bochum

von

MARIA WIEDEMANN
aus Bochum

Bochum 1987

eingereicht am: 24.6.1987
mündliche Prüfung am: 22.7.1987

Vorsitzender:	Prof. Dr. W. Kutzelnigg
Referent:	Prof. Dr. G. Bergmann
Korreferent:	PD Dr. H.-J. Götze
Dritter Prüfer:	Prof. Dr. G. Snatzke

Diese Arbeit wurde am Lehrstuhl für Analytische
Chemie der Ruhr-Universität Bochum in der Zeit
von September 1982 bis Dezember 1986 durchgeführt.

Herrn Prof. G. Bergmann danke ich herzlich für die
wertvollen Anregungen und die stets fördernde
Unterstützung meiner Arbeit.

Bei allen Kollegen bedanke ich mich für die ständige
Diskussionsbereitschaft und Zusammenarbeit.

Gliederung

1	Einleitung	1
2	Ausgangsposition der Arbeit	4
2.1	Literaturübersicht lineares Photodioden- array	4
2.1.1	Eigenschaften von Diodenarray- Spektrometern	5
2.1.2	Diodenarray-Spektrometer als Detektoren in der HPLC	9
2.2	Literaturübersicht Aminosäuren, Peptide und Proteine	14
2.2.1	UV-Spektrometrie der Aminosäuren und Proteine	14
2.2.2	Trennung von Peptiden und Aminosäuren in der HPLC	19
2.3	Aufgabenstellung	24
3	Beschreibung der Meßapparatur	25
3.1	Das chromatographische System	26
3.2	Das Diodenarray-Spektrometer	30
3.3	Datenerfassung und Datenverarbeitung auf dem Mikroprozessor 8080	34
4	Kenngößen des Diodenarray-Spektrometers	40
4.1	Dunkelstromverhalten	40
4.2	Stabilität der Lichtquelle	43
4.3	Abhängigkeit des Signals von der Integrationszeit	48
4.3.1	Dunkelstromsignal	49
4.3.2	Nutzsignal	56
4.4	Fehlstrahlung	58
4.4.1	Einfluß der Fehlstrahlung auf die Extinktion	59
4.4.2	Berechnung des Fehlstrahlungsanteils	61
4.4.3	Auswahl eines geeigneten Modells zur Berechnung des Fehlstrahlungsanteils	66

4.4.4	Einfluß der Wellenlängeneinstellung auf die Fehlstrahlung	70
5	Kalibrierung und Mehrkomponentenanalyse in einem statischen System	73
5.1	Bestimmung der Extinktionskoeffizienten	73
5.2	Quantitative Mehrkomponentenanalyse der reinen Aminosäuren	79
5.2.1	Nachweisgrenze von aromatischen Aminosäuren	79
5.2.2	Mehrkomponentenanalyse eines statischen Systems	81
5.3	Einfluß des Lösungsmittels auf den Extinktionskoeffizienten	84
6	Quantitative Analyse aromatischer Aminosäuren nach chromatographischer Trennung	87
6.1	Auswerteverfahren	88
6.2	Analyse von Peptiden bekannter Zusammensetzung	93
6.2.1	Zusammensetzung der Peptide	93
6.2.2	Versuchsbedingungen	94
6.2.3	Berechnung der Konzentrationen und der Sollwertabweichungen	95
6.3	Analyse des tryptisch verdauten, S-Carboxymethylierten Lysozym	100
6.3.1	Struktur des Lysozym	101
6.3.2	S-Carboxymethylierung und tryptische Verdauung des Lysozym	104
6.3.3	Quantitative Analyse	108
7	Zusammenfassung	119
8	Literaturverzeichnis	122
Anhang		128
A1	Die Mehrkomponentenanalyse	128
A2	Übersicht über die verwendeten Programme	131
A3	Strukturformeln einiger Aminosäuren	132
A4	Peptide nach Spaltung der Disulfidbrücken und enzymatischer Spaltung	133
A5	Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole	134

1 Einleitung

Die Trennung von Substanzen mit Hilfe der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie wurde anfangs besonders bei schwer flüchtigen und thermisch instabilen Verbindungen angewendet. Inzwischen gehört die HPLC neben der GC zu den wichtigsten Trenn- und Bestimmungsverfahren in der instrumentellen Analytik, da große Fortschritte auf dem Gebiet der Säulentechnologie und der Instrumentierung gemacht wurden. Besonders durch die Entwicklungen auf dem Gebiet der Reversed-Phase-Chromatographie wurde die Analyse biologischer Proben revolutioniert. Bei geringen Probenvorbereitungen werden mit unpolaren stationären Phasen Trennungen mit guter Reproduzierbarkeit und hohem Auflösungsvermögen erzielt, so daß komplexe Gemische aus Peptiden oder Proteinen mit HPLC getrennt werden können. Anschließend kann zur Identifizierung der gereinigten Peptide eine Summen- oder Sequenzanalyse durchgeführt werden. Dieses Verfahren der Sammlung der einzelnen Fraktionen ist sehr aufwendig, und eine einfachere Methode zur Identifizierung der Peptide wäre wünschenswert.

Um eine quantitative Analyse durchzuführen, muß sich das Signal des Detektors linear zu Konzentration der Probe im Eluat verhalten. Neben der Linearität der Konzentrationsbeziehung spielt dabei auch das Rauschen, die Stabilität der Grundlinie und die Empfindlichkeit der Detektion eine Rolle. Die Detektoren können im wesentlichen in zwei Gruppen unterteilt werden, deren Verwendung von der Problemstellung abhängig ist. Durch einen unspezifischen Detektor werden alle eluierten Peaks im Chromatogramm registriert. Bei der selektiven Detektion wird eine bestimmte Substanzgruppe speziell und hochempfindlich, wie es z.B. bei einem Fluoreszenzdetektor der Fall ist, detektiert. Bei der UV/VIS-Detektion ist es notwendig, daß ein chromophores System zur Verfügung steht, das eine Absorption bei der gewählten

Wellenlänge verursacht. Zur Detektion biochemischer Substanzen wird meistens die UV/VIS-Detektion verwendet, da die Substanzen selbst ein chromophores System besitzen oder durch eine Derivatisierung eine chromophore Gruppe gebunden wird. Anfänglich wurden UV-Detektoren mit einem Filterphotometer verwendet, die die Messung der Absorption nur bei ganz bestimmten Wellenlängen gestattet. Durch die Einführung von UV-Detektoren mit Monochromatoren und Kontinuumstrahler ist die Wellenlänge, bei der das Chromatogramm aufgezeichnet wird, frei wählbar. Diese Wellenlänge wird jedoch meist während eines Chromatogramms nicht verändert. Mit Hilfe von Mehrkanaldetektionssystemen ist die gleichzeitige Registrierung verschiedener Wellenlängen möglich, um Substanzen mit Absorptionsmaxima bei verschiedenen Wellenlängen empfindlicher nachweisen zu können.

Bei komplexen Gemischen ist neben der quantitativen auch eine qualitative Bestimmung der einzelnen Substanzen von Interesse. Zur Identifizierung der einzelnen Komponenten reicht die Retentionszeit alleine nicht aus. Die UV-Spektren der Substanzen können hier jedoch eine Hilfe sein. Die Registrierung der Spektren während der Elution der Substanzen kann entweder bei konstanter Konzentration bei unterbrochenem Eluentenfluß innerhalb der Küvette oder ohne weitere Eingriffe bei sich verändernder Konzentration erfolgen. Durch die Einführung von Rapiidspektrometern werden diese zeitaufwendigen und schlecht automatisierbaren Verfahren überflüssig. Dabei erfolgt die Registrierung so schnell, daß die Konzentrationsänderung während der Elution des Peaks minimal ist. Bei der ersten Generation dieser Spektrometer wird durch rotierende oder oszillierende Spiegel das aufgespannte Spektrum über einen feststehenden Austrittsspalt des Monochromators registriert. Durch den Verzicht auf mechanische Bauteile wird eine bessere Wellenlängenreproduzierbarkeit mit dispersiven Methoden durch Vielkanalspektrometer wie lineares Photodiodenarray oder Vidicon-Röhre erzielt. Das lineare Photodiodenarray besteht aus einer Vielzahl von

Dioden (256,512,1024,4096 Elemente), die quasi simultan mit einer internen Abfrage ausgelesen werden. Die Vidicon-Röhre stellt ein zweidimensionales Phodiodenarray mit einer Elektronenstrahlabfrage dar. Besonders das lineare Photodiodenarray findet inzwischen auf Grund seiner günstigeren Eigenschaften im Vergleich zur Vidicon-Röhre eine weite Verbreitung als Detektor in der HPLC.



2 Ausgangsposition der Arbeit

2.1 Literaturübersicht lineares Photodiodenarray

Der Aufbau eines linearen Photodiodenarrays (LPDA) wird von Jacob (7) sehr genau beschrieben. Hier werden noch einmal die wichtigsten Merkmale eines LPDA zusammengefaßt. Das lineare Photodiodenarray besteht aus einem n-leitenden Silizium-Einkristall, in dem p-leitende Streifen eindiffundiert sind. Jeder Streifen bildet mit dem umgebenden n-Silizium ein pn-Photodiode. Ein Array mit z.B. 512 Dioden ist bei einer Breite von 12.5 μm und einer Höhe von 2.5 mm für jede einzelne Diode insgesamt 12.8 mm breit und 2.5 mm hoch. Somit hat jede Diode eine spaltähnliche Geometrie mit einem Seitenverhältnis von 1:100. Jeder Diode ist ein Kondensator parallel geschaltet, der am Anfang eines Meßzyklus voll aufgeladen ist. Die Entladung der Kondensatoren wird durch auftreffende Photonen auf die photoempfindliche Schicht und thermisch erzeugte Ladungsträger innerhalb der Photodiode (Dunkelstrom) verursacht. Die zur Aufladung des Kondensators am Ende eines Integrationszyklus benötigte Ladungsmenge ist die Meßgröße, die von der Strahlungsintensität und der Integrationszeit, der Zeit zwischen zwei Startimpulsen, abhängt. Die Integrationszeit ist für alle Dioden gleich, obwohl absolut gesehen das Auslesen der einzelnen Dioden zu verschiedenen Zeitpunkten stattfindet. Die Dioden sind aus Gründen der Zweckmäßigkeit in gerad- und ungeradzahlige Dioden aufgeteilt die durch zwei Multiplexschaltungen mit den Ausgängen (Videoausgänge) verbunden werden. Mit Hilfe eines von außen angelegten Clocksignals und eines Schieberegisters werden die Kondensatoren der einzelnen Dioden nacheinander wieder aufgeladen. Die Signale der gerad- und der ungeradzahligen Dioden liegen alternierend an den Videoausgängen an. Zu jedem Detektorelement

gehört neben der aktiven Photodiode eine Dummydiode, die so angeordnet ist, daß auf sie keine Strahlung fallen kann. Durch Differenzbildung zwischen den Signalen dieser beiden Diodentypen wird der Einfluß des Dunkelstroms und des Schaltrauschens verringert.

2.1.1 Eigenschaften von Diodenarrayspektrometern

Die simultane Detektion kann man instrumentell in multiplex- und multichannel-Techniken unterscheiden. Bei der multiplex-Technik wird die kodierte Information (in der Frequenzdomäne) durch einen einzigen Detektor empfangen. Durch mathematische Methoden wie Hadamard- und Fourier-Transformation werden die Daten in spektrale Informationen gewandelt. Die simultane Detektion eines Spektralbereichs mit N spektralen Auflösungselementen reduziert die Beobachtungszeit - im Vergleich zur sequentiellen Spektrenregistrierung mit konsekutiver Beobachtung der einzelnen Auflösungselemente - um den Faktor N bei unverändertem Signal-Rausch-Verhältnis. Bei gleichbleibender Beobachtungszeit wird das Signal-Rausch-Verhältnis um den Faktor $\sqrt{N}$ verbessert, da jedes einzelne Element mit der N -mal längeren Zeit beobachtet wird (multiplex Vorteil). Aus der Vielzahl der Vielkanal-Detektoren, die von Talmi (1,2) beschrieben worden sind, hat das lineare Photodiodenarray (LPDA) die meiste Beachtung und Anwendung gefunden, da es auf Grund seiner spektralen Merkmale die besten Voraussetzungen als UV/VIS-Spektrometer mitbringt.

Auf Grund der trapezförmigen Empfindlichkeitsverteilung der photosensitiven Fläche einer Diode ist eine partielle Überlappung der spektralen Information vorhanden, obwohl diskrete Dioden vorliegen. Demzufolge ist bei der Messung der Intensität einer Hg-Linie die Intensität je nach Wellenlängeneinstellung unterschiedlich groß, wenn man wie bei Winge,

Fassel und Eckels (5) den abgebildeten Wellenlängenbereich um einen kleineren Betrag als den, der dem Wellenlängenbereich einer einzelnen Diode entspricht, verschiebt. Der dynamische Bereich des LPDA ist eine Funktion der Diodengröße (3) und gibt das Verhältnis des maximalen Signalniveaus zum Rauschen an, das in der Größenordnung von 10000 liegt. Dieser Wert wird jedoch von einem Photomultiplier um 2 Größenordnungen übertroffen (3). Ein wesentlicher Vorteil der Vielkanaldetektion ist ihre gute Wellenlängenreproduzierbarkeit. Bei scannenden Spektrometern ist die Wellenlängenreproduzierbarkeit mechanisch begrenzt. Jones(3) beschreibt, daß die Wellenlängenreproduzierbarkeit von Diodenarrayspektrometern von geometrischen Faktoren wie Vibrationen und thermischen Expansionen der optischen Bauteile bestimmt wird. Dabei spielt auch die Stabilität der Lichtquelle eine Rolle. Talmi und Simpson (4) zeigten, daß die Dioden unter den angegebenen Betriebsbedingungen keinen Memory-Effekt aufweisen ($<0.1\%$) und innerhalb von 1 μsek wieder voll aufgeladen werden. Auch das Übersprechen auf benachbarte Dioden wird als minimal angesehen.

Da das Rauschen einen entscheidenden Einfluß auf den dynamischen Bereich hat, werden die Quellen des Rauschens und seine Verringerung von Simpson (6) untersucht. Danach muß zunächst zwischen dem 'fixed pattern output' und dem statistischen Rauschen unterschieden werden. Das charakteristische Muster des Dunkelstroms ist eine Kombination der Leckströme der Photodioden und des Schaltrauschens. Jacob (7) korrigierte diesen Effekt durch Subtraktion des Dunkelstroms. Das eigentliche Rauschen wird durch Photonenrauschen der auftreffenden Strahlung, dem Schrotrauschen des Dunkelstroms, dem Verstärkerrauschen und unvollständiger Aufladung der Dioden bestimmt. Durch eine Kühlung des Arrays mit einem Peltierkühlelement verringerte Simpson den Dunkelstrom und damit auch sein Rauschen pro 6.7°C Temperatursenkung um den Faktor 2.

Von Talmi wird die Rauschkomponente des Intensitätssignals auch auf unterschiedliche Verstärker für die ungeraden und die geraden Dioden mit nicht genau gleichen Verstärkungsfaktoren zurückgeführt. Dieses Muster, das dem Intensitätssignal überlagert ist, und auch durch statistische Schwankungen der Empfindlichkeit der einzelnen Dioden beeinflusst wird, ist stark intensitätsabhängig und wird nach Talmi (8) durch Berechnung der Extinktion zum größten Teil beseitigt. Eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses wird durch Akkumulation aufeinanderfolgender Spektren, durch Zusammenfassung benachbarter Dioden und durch die Verlängerung der Integrationszeit möglich (3). Nach Horlick und Coddington (9) ist die proportionale Zunahme der Signalamplitude auf die Integrationszeiten zwischen 20 und 800 ms begrenzt. Bei höheren Integrationszeiten wird der Einfluß des Dunkelstroms auf das Signal zu groß. Diese Abhängigkeit des Dunkelstroms von der Integrationszeit und sein Einfluß auf das gemessene Signal wurde bereits von Jacob (7) beschrieben. Ein variable Integrationszeitverfahren wird von Talmi (8) angewendet, um das Signal-Rausch-Verhältnis auch bei geringen Intensitäten durch längere Integrationszeiten zu verbessern.

Der dynamische Bereich eines Spektrometers wird neben dem Rauschen auch durch Streulicht begrenzt. Von Talmi (8) werden Falschlichtanteile zwischen 0.03 und 0.18 % festgestellt, so daß nach Talmis Vorschlag Extinktionen oberhalb von 2.0 nicht gemessen werden sollten. Talmi weist auch darauf hin, daß die Hauptquelle des Falschlichtanteils die optischen Komponenten des Polychromators sind. Falschlicht, das auch durch Lichtstreuung an der Quarzscheibe, die die photoempfindliche Schicht abdeckt, hervorgerufen werden kann, spielt hierbei nach seiner Auffassung keine Rolle. Von Dessy et.al. (10) wird vorgeschlagen durch konkav-holographische Gitter den Fehlstrahlungsanteil zu verringern, so daß die sphärische Abberation und Reflexions- und Transmissionsverluste minimiert werden. Durch die konkave Wölbung des Gitters kann auf weitere optische Bauteile verzichtet wer-

den. Auch durch Vorfilterung mit einem Monochromator mäßiger Dispersion und der Berücksichtigung der bekannten Fehlstrahlung durch Korrektur-Verfahren soll nach Talmi (8) eine Vergrößerung des linearen Bereichs möglich sein. Die Linearität des Diodenarrays alleine, die Talmi (8) mit Graufiltern bestimmt hat, wurde zwischen 0.1 und 4 Extinktionseinheiten bestätigt.

Der Einsatz eines linearen Photodiodenarrays im UV/VIS-Bereich ist besonders bei der Beobachtung zeitkritischer Phänomene interessant. In einem von Talmi herausgegeben Buch (11) werden Artikel zahlreicher Autoren zusammengestellt, die sich mit der Anwendung von Vielkanaldetektoren in der Spektroskopie beschäftigen. Marino und Ingles (12) beobachteten die Chemilumineszenz von Singulett-Sauerstoff und bestimmten so Reaktionsgeschwindigkeiten. Jones (13) beschreibt den Einsatz des LPDA bei der Beobachtung von Redoxzwischenprodukten mit Hilfe einer optisch transparenten Elektrode, so daß mit Hilfe der Spektren der Zwischenprodukte Aussagen über den Reaktionsmechanismus gemacht werden können. Der Einsatz von LPDA in der HPLC ist inzwischen weitverbreitet (siehe nächstes Kapitel).

Die Kombination von multiplex- und multichannel-Techniken wird von Aryamany-Mugisha und Williams (14) und Okamoto, Kawata und Minami (15) beschrieben. Durch den Einsatz des LPDA als Detektor eines Interferometers werden Eintrittsspalt, Apertur und bewegliche Spiegel überflüssig. Auch in der Atomemission werden LPDA bei hohem Auflösungsvermögen des Polychromators eingesetzt. Der von den 1024 oder 4096 Dioden erfaßte Spektralbereich ist jedoch relativ klein. Karanassios und Horlick (16) benutzen das LPDA als Detektor eines Echelle-Spektrometers, bei dem durch Dispersion, Selektion und Rekombination der Linien eine Abbildung auf dem Diodenarray erreicht wird. Die Reihenfolge der Linien wird durch Überlappung von Spektren höherer Ordnungen bestimmt. Durch eine Maske in der Fokalebene des Polychroma-

tors werden nur ausgewählte Elemente bestimmt und bis in den ppb Bereich nachgewiesen.

2.1.2 Diodenarrayspektrometer als Detektoren in der HPLC

Die schnelle kontinuierliche Registrierung von Spektren während der Elution liefert bereits bei einem Chromatogramm, das nur eine Stunde dauert, eine so große Datenmenge, die bei entsprechend kurzen Meßintervallen im Mbyte-Bereich liegen kann, daß die Verarbeitung und Speicherung dieser Informationsmenge unrationell erscheint. George und Maute (17) praktizierten eine Datenreduktion durch Registrierung von Chromatogrammen nur bei bestimmten Wellenlängen und Aufnahme von Spektren im Peakmaximum und an den Wendepunkten. Durch die Mehrwellenlängendetektion wird chromatographische Analysenzeit im Vergleich zu konventionellen UV-Detektion eingespart, da Chromatogramme bei verschiedenen Wellenlängen nicht mehr notwendig sind. Der Nachteil des LPDA als Detektor in der HPLC ist sein erhöhter Rauschpegel, so daß Drenth, Ghijsen und de Zeeuw (18) bei bekannten Verbindungen auf Grund der niedrigeren Nachweisgrenze den konventionellen UV-Detektor benutzten.

Eine gleichzeitige Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses wurde nach George und Elgass (19) durch die Akkumulation von Spektren und Vergrößerung der spektralen Bandbreite (Zusammenfassung von Dioden) erzielt (zeitliche und spektrale Integration). Eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses durch die Zusammenfassung von Dioden wird darauf zurückgeführt, daß das Rauschen proportional zur Wurzel der Anzahl der Datenpunkte N , über die gemittelt wird, abnimmt. Durch die Summierung der Absorption über einen Spektralbereich beträgt das integrierte Signal jedoch nicht ein Vielfaches (N) des Absorptionsmaximums. Auf diese

Weise wird bei der Mittelwertbildung ein Verlust an Empfindlichkeit beobachtet. Von Ebel und Werner-Busse (20) wurde darauf hingewiesen, daß deshalb bei der Messung einer integralen Absorption das Signal-Rausch-Verhältnis nicht um den Faktor $\sqrt{N}$ verbessert wird.

Durch die Speicherung der Spektren der eluierten Substanzen sind vielfältige Möglichkeiten zur Computer unterstützten Auswertung gegeben. So können unter anderem Basislinienkorrekturen, Überprüfung der Homogenität eines eluierten Peaks mit verschiedenen Methoden, Anwendung der Mehrkomponentenanalyse zur quantitativen Bestimmung und Dekonvolution überlappender Peaks mit Hilfe der Faktoranalyse durchgeführt werden.

Zur Überprüfung der Homogenität eines eluierten Peaks werden verschiedene Methoden vorgeschlagen, falls UV-Spektren oder zumindest Werte bei verschiedenen Wellenlängen zur Verfügung stehen. Zu den mathematisch einfacheren Methoden gehören die Berechnung von Absorptionsverhältnissen bei verschiedenen Wellenlängen und die Differenzbildung zur Unterdrückung von Peaks bekannter Substanzen im Chromatogramm. Fell, Clark und Scott (21) bevorzugten die letztere Methode zur Identifizierung zweier spektral sehr ähnlicher Substanzen (Tyrosin und Dopamin) gegenüber der in diesem Fall unempfindlicheren Methode der Bildung von Absorptionsverhältnissen. Yang, Pownall und Gotto (22) identifizierten Tryptophan-haltige Peptide durch Bildung der Absorptionsverhältnisse bei diskreten Wellenlängen. Im Falle von Peakreinheit stehen die Absorptionen verschiedener Wellenlängen über den gesamten Konzentrationsverlauf in einem konstanten Verhältnis zueinander. Der Erfolg beider Verfahren hängt jedoch stark von der Wahl geeigneter Wellenlängen und dem Unterschied im Spektrum der Substanzen ab.

Mit Hilfe eines linearen Photodiodenarrays als Detektor in der Flüssigchromatographie ermittelte Jacob (7) bei der

quantitativen Analyse chromatographisch unvollständig getrennter Polycyclen eine Sollwertabweichung um 4 % bei Probenmengen im nmol Bereich. Einen Fehler bei der quantitativen Auswertung zwischen 3 und 6 % Abweichung beobachteten Milano et al. (24) bei einem Gemisch von polykondensierten Aromaten; ist die Anzahl der Standards geringer als die tatsächliche Anzahl von Komponenten in dem Gemisch, wird diese Abweichung besonders bei großer Ähnlichkeit der Spektren bei weitem übertroffen. Rossi und Pardue (25) untersuchten den Einfluß des Auswertebereichs der Mehrkomponentenanalyse auf seine Meßgenauigkeit. Dabei mußte nicht der ganze zur Verfügung stehende Wellenlängenbereich zur Auswertung benutzt werden, wenn man sich auf den Teil beschränkte, in dem spektrale Informationen vorliegen. Die Auswahl des Auswertebereichs wurde in diesem Fall rein empirisch vorgenommen. Rossi, Desilets und Pardue (26) führten zur Identifizierung einzelner Peaks eines Chromatogramms einen spektralen Vergleich mit Standardspektren durch und konnten dann auf Grund der gefundenen Konzentration und relativen Standardabweichung 12 verschiedene polykondensierte Aromaten zuordnen.

Durch die Bildung der 2.Ableitung der Spektren hoben Fell et.al. (23) die qualitativen spektralen Merkmale stärker hervor, so daß eine Identifizierung der Substanzen erleichtert wurde. Milano, Lam und Grushka (27,28) wendete die Derivativspektroskopie zur Dekonvolution überlappender Peaks an. Durch die Berechnung der 1.Ableitung wird normalerweise das Signal-Rausch-Verhältnis verringert; liegen jedoch systematische Fehler vor, wie sie bei Einstrahlgeräten durch Lampenfluktuationen und Drift hervorgerufen werden, bleibt durch die Bildung der Ableitung diese systematische Abweichung unberücksichtigt. Auch Tahboub und Pardue (29) zeigten, daß durch die Berechnung der 2.Ableitungsspektren eine vorhandene Untergrundabsorption kompensiert werden kann, und konnten so die Mehrkomponentenanalyse auch erfolgreich in der Derivativspektroskopie anwenden.

Durch eine Glättung des Ausgangssignals des LPDA mit einem Polynom 2.Grades reduzierten Milano, Lam und Grushka (27,28) das Rauschen um den Faktor 1.5. Auch Talmi (8) wendete die Glättung nach Golay-Savitsky auf die Rohdaten an, so daß eine Identifizierung stark verrauschter Spektren erleichtert wurde.

Die Dekonvolution von Peaks, die in der Zeitdomäne überlappen, kann auch mit Hilfe der Faktoranalyse durchgeführt werden. Durch die Information aus einer Datenmatrix, wie sie z.B. durch die Detektion eines HPLC-Eluats mit einem Vielkanalspektrometer erzeugt wird, ist die Trennung überlappender chromatographischer Peaks mathematisch möglich. Sind die Spektren der Substanzen bekannt, können die einzelnen Komponenten quantitativ durch die Mehrkomponentenanalyse bestimmt werden. Unter der Voraussetzung, daß sich die Absorption linear mit der Konzentration ändert, wird durch die Faktoranalyse die Zahl der relevanten Eigenvektoren und damit die Zahl der Komponenten bestimmt. Von Linke (61) wurde die in den Eigenvektoren einer Meßwertmatrix von Infrarot-Spektren enthaltene Information über die Extinktionskoeffizienten und Konzentrationen durch die Faktoranalyse wiedergewonnen. Dabei wird die Anzahl von Komponenten in einem Mehrkomponentensystem mit maximal 3 Komponenten jedoch unbekannter Zusammensetzung bestimmt und eine qualitative und quantitative Mehrkomponentenanalyse durchgeführt. Bei Mehrkomponentensystemen mit erheblichen Bandenüberlagerungen nimmt die Präzision, mit der die einzelnen Spektren bestimmt werden, ab.

Bis zu drei überlappende Substanzen in einem Chromatogramm hat Lacey (30) unter der Voraussetzung nachgewiesen, daß die berechneten Konzentrationen nicht negativ sein können und die spektrale Ähnlichkeit der Komponenten nicht zu groß ist. Vandeginste, Derks und Kateman (31) bestimmten durch iterative Anwendung der Faktoranalyse zunächst das

Elutionsprofil und berechneten anschließend die Spektren der Substanzen. Wird die Auflösung der chromatographischen Peaks schlechter als 0.3, ist die Unterscheidung der einzelnen Komponenten erschwert, da die Vektoren zu einer Linear-kombination des realen Elutionsprofils konvergieren können. Die Qualität der quantitativen Bestimmung mit Hilfe der Faktoranalyse hängt auch nach Osten und Kowalski (32) stark von der Auflösung der Peaks und der spektralen Ähnlichkeit der Substanzen ab.

Der Einsatz von Diodenarray-Detektoren bei der Lösung von Trennproblemen in der Biochemie und der Pharmazie wird besonders häufig beschrieben (10,18,21-23,33-35). Die Reversed-Phase Trennung von Peptiden mit anschließender Identifizierung Tryptophan-haltiger Peptide durch die Bildung von Absorptionsverhältnissen bei diskreten Wellenlängen wurde von Yang, Pownall und Gotto (22) durchgeführt. Dazu war jedoch die Bestimmung von Phenylalanin und Tyrosin durch Aminosäureanalyse notwendig. Einen qualitativen Nachweis der drei aromatischen Aminosäuren führten Grego, Nice und Simpson (35) durch den Vergleich der Lage der Minima der Spektren der 2.Ableitung durch. Der Nachweis von Tyrosin bei Anwesenheit von Tryptophan ist nur bei einem Überschuß an Tyrosin gegenüber Tryptophan möglich.

Die weitere Entwicklung auf dem Gebiet der HPLC durch die Einführung der schnellen HPLC und der Microbore-Säulen-Technik zur Senkung der Nachweisgrenze macht eine schnelle Datenerfassung in noch kürzeren Zeitabständen notwendig, um schmale Peaks mit geringen Halbwertsbreiten zu erfassen. Greco et.al. (35) wendeten die Microbore-Säulen-Technik zur Reinigung und Konzentrierung von ng Mengen von Polypeptiden und Proteinen an. Das Volumen der Peaks wird reduziert, so daß im Vergleich zur normalen HPLC eine Konzentrierung der Probe im Eluat erfolgt.

2.2 Literaturübersicht Aminosäuren, Peptide und Proteine

Der Aufbau von Eiweißmolekülen in der Zelle wird von der Ribonucleinsäure (RNA) gesteuert. Durch die Sequenz von 3 Nucleinsäuren in der RNA werden die betreffenden Aminosäuren in einer festgelegten Reihenfolge aneinandergefügt. Da der genetische Code ein Tripletcode ist, gibt es auf Grund der 4^3 Kombinationsmöglichkeiten der 4 verschiedenen Basen der RNA 64 verschiedene Codons. Die meisten der 20 Aminosäuren haben deshalb einen degenerierten Code (z.B. Leucin hat 6 Codons), nur Methionin und Tryptophan haben je ein Codon. Der Codon ist jedoch eindeutig und universell, so daß immer nur eine ganz bestimmte Aminosäure, die für alle Organismen gleich ist, eingebaut werden kann. Aus diesem Grund sind Methionin und Tryptophan von besonderem Interesse bei der Analyse von Proteinen, da an dieser Stelle eindeutige Rückschlüsse auf die RNA-Struktur und damit im Endeffekt auf die DNA-Sequenz möglich sind. Tryptophan wird jedoch bei der salzsauren Hydrolyse zur Spaltung der Proteine und anschließende Aminosäureanalyse unreproduzierbar zerstört, so daß eine quantitative Bestimmung von Tryptophan mit dieser Methode nicht möglich ist. Die UV-Spektroskopie stellt eine zerstörungsfreie Methode zur quantitativen Bestimmung von chromophoren System dar.

2.2.1 UV-Spektrometrie der Aminosäuren und Proteine

Eine quantitative Bestimmung von Substanzen kann über die Absorption bei Kenntnis des molaren dekadischen Absorptionskoeffizienten (Extinktionskoeffizient) ϵ erfolgen. Die Grundlage der Analyse ist das Boguer-Lambert-Beersche Gesetz, dessen Anwendung im Anhang erläutert wird. Für die UV-Absorption der Proteine und Peptide im Bereich von 250 -

320 nm sind fast ausschließlich die drei aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan verantwortlich. Meist wird das Spektrum jedoch von der Absorption des Tryptophans beherrscht, da große Unterschiede in den maximalen Extinktionskoeffizienten bestehen. Dabei leistet ein Tryptophan-Rest einen viermal größeren Beitrag zur Absorption eines Proteins als ein Tyrosin-Rest und einen ungefähr 27mal größeren Beitrag als ein Phenylalanin-Rest bei gleichen molaren Verhältnissen (36). In Abb. 2.1 sind die Extinktionskoeffizienten der aromatischen Aminosäuren dargestellt. Zwischen 250 und 210 nm tragen auch Cystin, Histidin und Methionin zur UV-Absorption bei (37). Nach Dannenberg (38) zeigen Proteine mit großem Molekulargewicht zusätzlich eine zu kurzen Wellenlängen ansteigende Schwächung der Strahlung durch Streuung des eingestrahltten Lichts an der Moleküloberfläche. Die Detektion von Peptiden und Proteinen bei 200 bzw. 210 nm ist 25 - 50mal empfindlicher als bei 280 nm und 100mal empfindlicher als bei 254 nm, da hier die Absorption der Peptidgruppe angeregt wird. Das Maximum der Extinktionskoeffizienten bei ca 190 nm liegt in der Größenordnung von $7000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (36). Die Peptidabsorption hängt jedoch stark von der Konformation ab. Wetlaufer (39) stellte fest, daß die Lage und Intensität der Hauptbande davon beeinflußt wird, ob die Polypeptidkette durch ungeordnete Zufallswindungen, α -Helix oder β -Faltblattstrukturen aufgebaut ist, so daß keine quantitative Aussage mit Hilfe der Peptidabsorption möglich ist.

Bei hohen pH-Werten ändert sich das UV-Spektrum von Proteinen auf Grund der Ionisierung des Tyrosin-Restes zum Tyrosyl-Anion, dessen Absorptionsbande bei deutlicher Intensitätszunahme (Faktor 1.6) um ca. 20 nm zu längeren Wellenlängen verschoben ist, wie in Abb. 2.2 dargestellt ist (36). Edelhoch (40) verbesserte dadurch die quantitative Bestimmung von Tyrosin in Proteinen, das sonst häufig bei Anwesenheit von Tryptophan durch dessen größeren Extinktionskoeffizienten überdeckt ist. In globulären Proteinen sind die

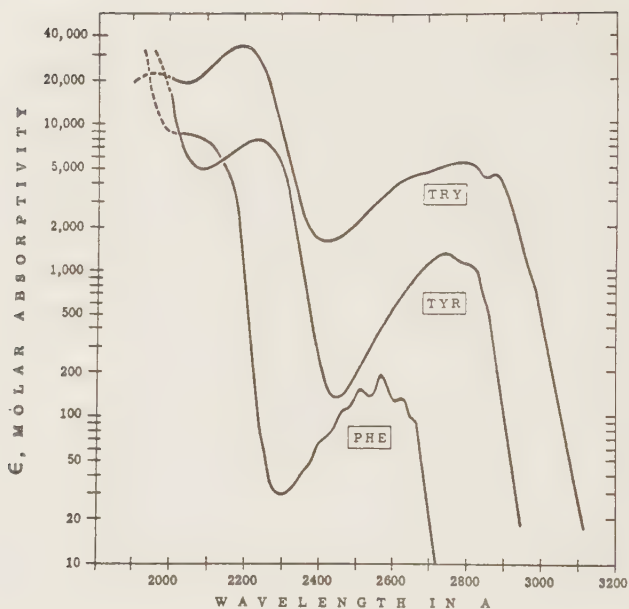


Abb. 2.1 UV-Spektren der aromatischen Aminosäuren bei pH 6 nach (33)

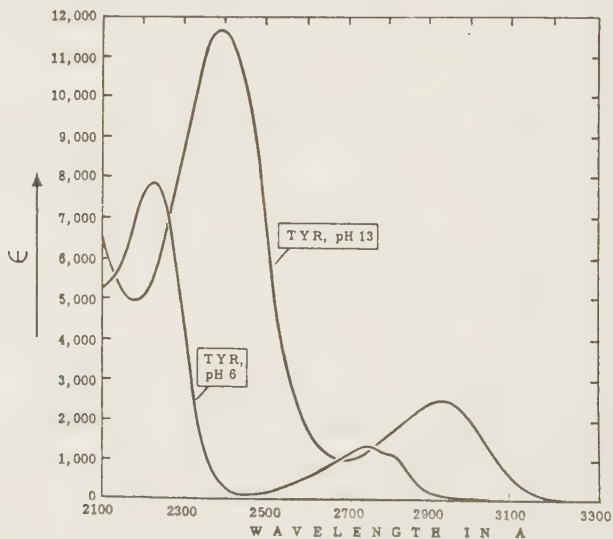


Abb. 2.2 UV-Spektren Vergleich von Tyrosin und dem Tyrosyl-Anion nach (33)

meisten phenolischen OH-Gruppen durch Wasserstoffbrücken gebunden und in die Tertiärstruktur des Proteins eingefaltet, so daß eine vollständige Dissoziation des Tyrosins zum Tyrosyl-Anion erst nach der Denaturierung des Proteins vorliegt (38).

Donovan (41) untersuchte den Einfluß des Lösungsmittels in Abhängigkeit von seiner Polarität auf die Lage des Spektrums der aromatischen Aminosäuren, mit dem das Lösungsmittel eine Wechselwirkung eingeht. Durch diese Wechselwirkung ändert sich die Energie des Grundzustandes und des angeregten Zustands des Chromophors, so daß Änderungen der Lage und der Intensität der Absorption beobachtet werden. Die Verteilung der aromatischen Reste zwischen dem für das Lösungsmittel unzugänglichem Innern der Tertiärstruktur und der für das Lösungsmittel zugänglichen Außenseite des Proteins muß deshalb zur quantitativen Bestimmung durch die Denaturierung des Proteins aufgehoben werden. Andererseits wendeten Ichakawa und Terada (42) bei bekannter Aminosäuresequenz diesen Wechsel der Absorptionseigenschaften an, um die Umgebung des Phenylalanins und den Grad der Denaturierung des Proteins zu bestimmen.

Edelhoch (40) demonstrierte, daß das Spektrum eines denaturierten Proteins durch die Summe der vorhandenen Aminosäuren angenähert werden kann. Er verwendete als Modellsubstanzen Aminosäuren, deren Amino- und Carboxylgruppe blockiert sind, z.B. N-Acetyltryptophanmethylester; damit wurden die spektralen Eigenschaften eines Aminosäuremoleküls angenähert, das in der Mitte einer Peptidkette eingebaut ist. Werden jedoch durch die Umsetzung eines Proteins mit einem Enzym, das die Polypeptidkette nach ganz bestimmten Aminosäuren spaltet, Peptide gebildet, die endständige aromatische Aminosäuren enthalten, entspricht dieses Modell der blockierten Aminosäuren nicht mehr den Gegebenheiten im Molekül. Die Wellenlängenverschiebung der freien Aminosäure zur blockierten Aminosäure wurde von Edelhoch mit 1 nm

angegeben. Durch die Kombination der blockierten Aminosäuren wird ein ähnliches Spektrum erzeugt, das dem des Proteins entspricht; es bleibt jedoch immer noch eine geringfügige Rotverschiebung des Proteinspektrums gegenüber den Spektren der Modellsubstanzen zurück. Es wird vermutet, daß erstens die Modellsubstanzen nicht vollständig den Verbindungen in der Peptidkette in Hinsicht auf ihre spektralen Eigenschaften entsprechen, und zweitens nach der Denaturierung immer noch Reststrukturen im Protein bestehen, so daß die Solvatisierung der Chromophore unvollständig ist.

Balestrieri et. al. (43) wendeten wie Levine und Frederici (44) zur quantitativen Bestimmung der Aminosäuren im Protein die Derivativspektroskopie an, so daß Einflüsse durch Lichtstreuung und der relativ unstrukturierten Absorption des Cystins ausgeschaltet werden. Durch Zugabe definierter Zusätze von N-Acetylphenylalaninethylester zur Proteinlösung bestimmten Balestrieri et. al. (43) die Menge an Phenylalanin durch Regressionsanalyse, wobei als Meßgröße der Abstand vom Maximum bei 257 nm zum benachbarten Minimum bei 259 nm im Derivativspektrum bestimmt wurde. Durch die Überlappung der Spektren von Tyrosin und Tryptophan war die Bestimmung von Tryptophan nur bei einem Verhältnis von Tryptophan/Tyrosin größer als 1 ohne Korrekturfaktor möglich. Levine und Frederici (44) stießen bei der Anwendung der Mehrkomponentenanalyse zur Bestimmung der aromatischen Reste im Lysozym auf die Grenzen der sonst genauen Bestimmungsmethode, was sie auf die noch vorhandenen Sekundärstrukturen in dem denaturierten Lysozym zurückführten.

Durch die chemische Umsetzung der Aminosäuren wird das Spektrum der gebildeten Derivate im Vergleich zu dem der Aminosäuren in seiner Intensität verstärkt und in seiner Lage zu längeren Wellenlängen verschoben. Zwei spezifische Farbreaktionen zur chemischen Umsetzung von Tryptophan und Tyrosin in Peptiden und Proteinen wurde von Chrastil (45) beschrieben, die die quantitative Bestimmung dieser beiden

Aminosäuren mit Hilfe der Absorption im sichtbaren Bereich des Spektrums gestatten. Dabei reagieren die aromatischen Seitenketten der Aminosäuren zu farbigen Derivaten. Eine Hydrolyse der Proteine ist nicht notwendig.

Durch die Umsetzung von Aminosäuren mit Phenylisothiocyanat zeigen alle Phenylthiohydantoinderivate der Aminosäuren eine Absorption zwischen 250 und 280 nm. Levine und Lehrman (46) gelang mit Hilfe eines LPDA-Spektrometers die Identifizierung und Quantifizierung von Aminosäurephenylthiohydantoinen mit extrem ähnlichen Spektren durch die Mehrkomponentenanalyse. Die Reaktionen von Aminosäuren mit Ninhydrin, 5-Dimethylamino-1-naphthalinsulfonylchlorid (Dansylchlorid) oder o-Phthalaldehyd senken die Nachweisgrenze bis in den pmol-Bereich, wobei häufig auch die fluoreszierenden Eigenschaften der gebildeten Derivate ausgenutzt werden (47). Grenzen dieser Methoden werden von Heinrichson und Meredith (48) beschrieben.

2.2.2 Trennung von Peptiden und Aminosäuren in der HPLC

Die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie stellt eine schnelle Methode zur Trennung und Reinigung von Peptiden und Proteinen dar. Durch Sammlung der einzelnen Fraktionen kann anschließend ihre Primärstruktur durch Aminosäureanalyse aufgeklärt werden. Deshalb spielt bei der Trennung von Peptiden und Proteinen neben der Auflösung der eluierten Substanzen auch die Wiederfindungsrate eine Rolle.

Die Trennung der Biopolymere kann auf Grund von Unterschieden in Größe, Ladung oder hydrophoben Eigenschaften durchgeführt werden. Die Trennung über die Molekülgröße erfolgt am zweckmäßigsten mit Hilfe der Gelfiltrations-Chromatographie, die vor allem bei der Trennung großer Proteine angewendet

wird. Dabei finden keine Wechselwirkungen mit der stationären Phase statt. Die Ionenaustauschchromatographie trennt die Moleküle auf Grund von Affinitätsunterschieden der ionogen Verbindungen zu dem Gegenion an der Ionenaustauschermatrix. Das klassische Verfahren der Aminosäureanalyse benutzt zur Trennung ein wäßriges Puffersystem und eine Ionenaustauscher-Säule. Die Detektion erfolgt durch Umsetzung der Aminosäuren mit Ninhydrin nach der Trennung.

Die Reversed-Phase-Chromatographie (RP) ist die am weitesten verbreitete und leistungsfähigste Technik zur Trennung von Peptiden, da sie schnell, empfindlich und einfach in der Handhabung bei gleichzeitig gutem Auflösungsvermögen ist. Bei der RP-Chromatographie ist die Oberfläche der stationären Phase mit C_{18} - oder C_8 -Phasen belegt, mit der die Biomoleküle hydrophobe Wechselwirkungen eingehen. Die Substanzen werden in der Reihenfolge zunehmender hydrophober Eigenschaften eluiert. Auch Molnar und Horvath (49) zeigten die Überlegenheit der Trennung von Peptiden über unpolare stationäre Phasen gegenüber der Trennung mit Ionenaustauscher-Säulen. Mit RP-Chromatographie wurde auch die Trennung von Aminosäuren von Heinrikson und Meredith (48) durchgeführt. Dazu wurde nach der Derivatisierung der Aminosäuren mit Phenylisothiocyanat zu Phenylthiocarbamyl-Derivaten bei annähernd neutralem pH-Wert die Aminosäuren bis in den picomol-Bereich nachgewiesen.

Von einigen Autoren wurde versucht, eine Beziehung zwischen hydrophobem Verhalten und Retentionszeit aufzustellen. Molnar und Schoeneshoefer (50) stellten eine Korrelation zwischen Retentionszeit und Molekülstruktur bei der Trennung von Peptiden auf unpolarer stationärer Phase fest. Dabei korrelierten die addierten Retentionszeiten der einzelnen Aminosäuren gut mit den beobachteten Retentionszeiten der Peptide. Oligomere des Phenylalanins wurden in annähernd äquidistanten Abständen eluiert. Auch Waterfield (47) berichtet, daß Vorhersagen über die Elutionsreihenfolge von

Peptiden auf Grund ihrer hydrophoben Eigenschaften gemacht werden können. Bei Peptiden mit mehr als 20 Aminosäuren oder bei einer Häufung von hydrophoben Aminosäuren an einer Stelle des Peptids können jedoch Abweichungen auftreten.

Um auch bei größeren Unterschieden der hydrophoben Eigenschaften der Peptide eine gute Trennung zu erreichen, wird häufig mit Gradientenelution gearbeitet. Dabei wird eine wäßrige Pufferlösung mit steigenden Anteilen eines organischen Elutionsmittels versetzt, so daß zum Schluß auch die stark hydrophoben Peptide eluiert werden können. Das meist verwendete organische Elutionsmittel ist Acetonitril. Andere Lösungsmittel wie Methanol und i-Propanol erzeugen auf Grund ihrer höheren Viskosität einen größeren Druckabfall in der Säule; auch ihre Elutionskraft für die RP-Chromatographie ist im Vergleich zu Acetonitril geringer (51). Um nach der chromatographischen Trennung die Peptide für Strukturuntersuchungen wiederzugewinnen, ist es von Vorteil, die Peptide in einem Lösungsmittel vorliegen zu haben, das durch Gefriertrocknung entfernt werden kann. Wasser und Acetonitril stellen hier kein großes Problem dar. Bei der Auswahl der Puffersubstanzen kann man z.B. auf Ammoniumacetat, Ammoniumbicarbonat, Triethylammoniumphosphat oder Trifluoressigsäure (TFA) zurückgreifen (47). Winkler et al. (52) schilderten weitere Vorteile der TFA, die auf Grund ihrer geringen UV-Absorption im kurzwelligen UV-Bereich auch eine Registrierung des Chromatogramms zwischen 200 und 215 nm zuläßt, so daß die empfindlichere Absorption der Peptidgruppe beobachtet werden kann. Auch das von Rivier (53) eingesetzte Triethylammoniumphosphat zeigt eine gute UV-Durchlässigkeit bis 200 nm.

Die chromatographische Trennung hängt auch von der Wahl des pH-Wertes ab. Durch die eingeschränkte Stabilität des C_{18} -Materials bei hohen pH-Werten sollte der optimale Arbeitsbereich in der RP-Chromatographie bei pH-Werten zwischen 2 und 7.5 liegen. Bei einem niedrigen pH-Wert (2.5 - 3.5)

wurde von Rivier (53) eine bessere Auflösung für neutrale oder basische Peptide beobachtet. Dieses führte er darauf zurück, daß in diesem Bereich die meisten aciden funktionellen Gruppen nicht dissoziiert sind, alle basischen Gruppen jedoch protoniert sind.

Am Beispiel des Lysozym sollen einige Möglichkeiten aufgezeigt werden, wie unterschiedlich die Trennung von Peptiden durchgeführt werden kann. Um das Lysozym, das Protein des Hühnereiweiß, in seine Peptide zu spalten, müssen zuvor die Disulfidbrücken des Cystins, die eine Quervernetzung des Moleküls bewirken, gespalten werden, indem die Cystine reduziert und anschließend alkyliert werden. Durch das Enzym Trypsin wird dann die Polypeptidkette des Lysozym selektiv nach den Aminosäuren Arginin und Lysin getrennt. Dabei werden 14 Peptide und 4 freie Aminosäuren gebildet.

Sasagawa, Titani und Walsh (54) beschreiben die Trennung der Peptide des Lysozyms über Gradientenelution mit 0.1 % TFA, Wasser und Acetonitril bei einem pH-Wert von 2. Eine weitere Aufreinigung der Peptide wurde durch eine 2.Chromatographie der einzelnen gesammelten Fraktionen nach einer chemischen Modifizierung der Tryptophan-Reste in den Peptiden durchgeführt. Das mit Hilfe von o-Nitrophenylsulfenylchlorid gebildete Derivat des Tryptophan veränderte die hydrophoben Eigenschaften dieser Peptide, so daß sie zu einem späteren Zeitpunkt eluiert und von den vorher gleichzeitig eluierten Peptiden getrennt wurden. Auch Tanaka et al. (55) isolierten durch die Bildung von 2-Nitro-4-carboxyphenylsulfenyl-tryptophan die Tryptophan-haltigen Peptide durch die verlängerte Retentionszeit von den restlichen Fragmenten. Eine teilweise Veränderung der Elutionsreihenfolge wird von Haeffner-Gormley, Poludniak und Wetlaufer (56) und Waterfield und Scrace (57) beobachtet, da die Trennung bei anderen pH-Werten und mit anderen Puffersubstanzen durchgeführt wurde. In allen Fällen wurden durch eine Aminosäureanalyse die eluierten Peaks zumindest zum Teil identifiziert. Dieses ist möglich, da die Struktur des Lysozyms und damit auch die der

gebildeten Peptide bekannt ist. Die Anzahl der Peptide und ihre Länge kann jedoch durch die nicht vollständig ablaufenden Reaktionen - Spaltung der Disulfidbrücken, Alkylierung der Cystein-Reste und die anschließende enzymatische Spaltung durch das Trypsin - variieren.

Inzwischen stehen auch speziell für die Trennung von Biopolymeren entwickelte RP-Säulen zur Verfügung, die hinsichtlich ihrer geometrischen Gestalt und Füllmaterial dem Trennproblem besser angepaßt sind. Durch kurze Säulen (80 mm) mit einem vergrößertem Innendurchmesser (6.2 mm) wird eine schnelle Trennung mit hoher Auflösung und geringem Druckabfall an der Säule erreicht. Das Füllmaterial mit einer mittleren Porenweite von 150A ermöglicht die Trennung von Peptiden im Molekulargewichtsbereich von 1000 - 20000 Dalton (58).

2.3 Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit wird ein Diodenarray-Spektrometer als UV-Detektor für die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie eingesetzt. Als Trennproblem soll die Trennung von Peptiden und deren Detektion durch aromatische Aminosäure-Reste, die im UV-Bereich absorbieren, behandelt werden. Zusätzlich sollen einige Eigenschaften des Diodenarrays untersucht werden, die zu einer Verfälschung der Meßergebnisse führen können.

1. Neben der Charakteristik des Dunkelstroms und seinem Einfluß auf das Meßsignal soll das Verhalten des Dunkelstroms und des Meßsignals in Abhängigkeit von der Integrationszeit untersucht werden.
2. Die Berechnung von Fehlstrahlungsanteilen mit verschiedenen Algorithmen auch in Abhängigkeit von der Konzentration der Probe ist durchzuführen. Dabei sollen verschiedene Modelle zur Berechnung der Fehlstrahlungsanteile untereinander verglichen werden.
3. Die Stabilität der Strahldichteverteilung der Lichtquelle ist zu bestimmen, da das Diodenarray-Spektrometer als Einstrahlgerät konzipiert ist.
4. Die quantitative Bestimmung der aromatischen Aminosäuren in einem statischen System ist durchzuführen und die Richtigkeit und Genauigkeit der Mehrkomponentenanalyse zu bestimmen.
5. An einem realen System soll auf das HPLC-Eluat die Mehrkomponentenanalyse der aromatischen Aminosäure-Reste in Peptiden bekannter Zusammensetzung und der durch enzymatische Spaltung entstandenen Peptide des Lysozym angewendet werden.

3 Beschreibung der Meßapparatur

Die Meßapparatur ist als Blockdiagramm in Abb. 3.1 wiedergegeben. Sie gliedert sich in drei Teile. Zur Trennung der Substanzen dient das chromatographische System (C) mit den Pumpen, dem Gradientensteuergerät, dem Säulenofen mit Säule und einem UV-Detektor mit Durchflußzelle. Das Eluat der Säule wird zusätzlich durch eine Küvette, die zu dem Spektrometerteil (S) gehört, geführt. Die Detektion der Probe erfolgt hier mit einem linearen Photodiodenarray mit 512 Dioden. Zur Datenerfassung und Verarbeitung steht ein Mikroprozessor Intel 8080 (M) zur Verfügung. Außerdem können die Daten auf einen Auswerterechner übertragen und dort weiter bearbeitet werden.

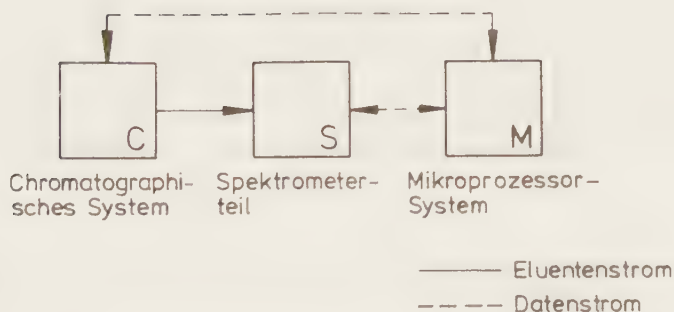


Abb. 3.1 Blockdiagramm der Meßapparatur

3.1 Das chromatographische System

Das HPLC-Gerät mit dem dazugehörenden Detektor wurde bereits in seinen Einzelheiten von Streckert (59) beschrieben. In Abb. 3.2 ist der Aufbau schematisch dargestellt. Zur Förderung eines pulsarmen Eluentenstroms sind zwei Kurzhub-Doppelkolbenpumpen¹ (P_a, P_b) vorhanden, deren Förderleistung (0.1 - 9.9 ml/min) durch das Gradientensteuergerät² (GST) zur Erzeugung einer bestimmten Gradientenzusammensetzung vorgegeben ist. Die Mischung der beiden Lösungen (L_a, L_b) bei der Gradientenelution erfolgt auf der Hochdruckseite im Druckaufnehmerblock der 2. Pumpe. Das Gradientensteuergerät erlaubt eine Programmierung des Gradienten in maximal 10 Segmenten mit linearer Steigung. Nach der Probenaufgabe (PA) über ein 6-Wege Dosierventil³ wird die Probe in einem thermostatisierbaren Ofen⁴ über eine Säule (HS) mit Vorsäule (VS) getrennt. Das Eluat wird zunächst in einem Spektralphotometer⁵ (SPH), dessen Wellenlänge zwischen 200 und 850 nm frei gewählt werden kann, mit einer 8 μ l Durchflußküvette (K) (Schichtdicke $d = 1$ cm) mit einer Vakuumphotozelle detektiert und das Chromatogramm mit einem Zweikanal-Kompensations-Linienschreiber⁶ (KS) analog aufgezeichnet. Zusätzlich liegt der Meßwert an einem 50poligen Digitalausgang BCD-kodiert mit Vorzeichen parallel an einem Digitalvoltmeter an. Ein Interface⁷ (IF) trennt die 14 Datenleitungen elektrisch durch Optokoppler vom Mikroprozessor. Zusätzlich wird

¹Typ 52.00, Dr.H. Knauer KG, Oberursel

²Typ 750/36, Applied Chromatography Systems, Luton England

³Typ 7125 Reodyne, Berkeley, USA

⁴Typ 60.00, Knauer siehe ¹

⁵PM2 DLC, Zeiss, Oberkochen

⁶Typ 42.00, Knauer siehe ¹

⁷Den Herren R.Singer und J.Schröder danke ich für die Erstellung des Interface

über ein Relais die Meßwertauslösung vom Rechner aus betätigt. Der dabei ausgelöste Wert liegt solange am Ausgang des Digitalvoltmeters (DVM) an, bis der Wert vom Datenerfassungsrechner (M) übernommen wird und ein Impuls die Meßwertauslösung freigibt (Abb. 3.3). Das Zeitintervall Δt zwischen zwei Meßwertauslösungen wird von den Parametern der Meßwert-
erfassung der Werte des Diodenarrays (siehe Kap. 3.2) bestimmt.

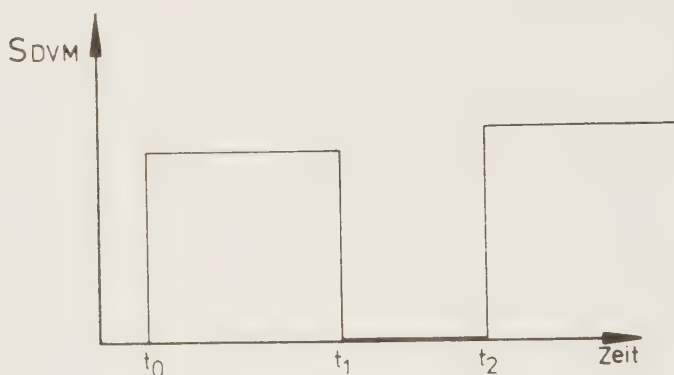


Abb. 3.3 Signal, das am Digitalvoltmeter anliegt, in Abhängigkeit von der Zeit
 t_0, t_2 - Meßwertauslösung
 t_1 - Freigabe der Meßwertauslösung
 $\Delta t = t_2 - t_0$ - Integrationszeit

Die Trennung der Peptide wurde auf einem Patronen-Säulensystem mit Fertigsäule^a bestehend aus einer Vorsäule (30 mm lang, 4 mm Innendurchmesser) und einer Hauptsäule (250 mm lang, 4 mm Innendurchmesser) mit einem totvolumen-armen Verbindungsstück durchgeführt. Trypsin, das als Enzym zur Verdauung des Proteins benutzt wurde, kann aus dem

^aNucleosil, 7 μm , C₁₈, von Knauer gefüllt

Peptidgemisch vor der chromatographischen Trennung nicht mehr entfernt werden. Es wird chromatographisch von dem Peptidgemisch getrennt, indem es sich irreversibel am Anfang der Säule ablagert. Durch den Einsatz der leicht austauschbaren und preiswerteren Vorsäule werden diese und andere höhermolekulare Verunreinigungen von der Hauptsäule ferngehalten. Da das Füllmaterial in beiden Säulen gleich ist, wird durch die Vorsäule die Trennung nicht verschlechtert. Mit einem Testgemisch wird bei 1 ml/min Fließgeschwindigkeit eine Bödenzahl von ca. 13000 auf 28 cm Säulenlänge ermittelt, das einer mittleren Bodenhöhe von 23.2 μm entspricht. Die Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten wurde überprüft; der Schätzwert der relativen Standardabweichung aus 4 Messungen beträgt 0.25 %. Die Zusammensetzung des Elutionsmittels bei der Gradientenelution zur Trennung des Peptidgemisches wird durch die beiden Lösungsmittel

A: Wasser, 0.1 % Trifluoressigsäure

B: Acetonitril, 0.1 % Trifluoressigsäure.

bestimmt. Eine Entgasung der Lösungsmittel wird durch Spülen mit Helium vorgenommen. Bei der Trennung wird mit der Gradientenprogrammierung die Zusammensetzung des Elutionsmittels von 10 auf 100% gesteigert, so daß auch stark hydrophobe Verbindungen eluiert werden können.

3.2 Das Diodenarray-Spektrometer

Der Aufbau des Photodiodenarray-Spektrometers, wie er in Abb. 3.4 wiedergegeben ist, mit der dazugehörenden Meßwerterfassung und Datenverarbeitung wurde mit einigen Änderungen von Jacob (7) übernommen. In Kap. 3.3 werden die Veränderungen an Hard- und Software beschrieben. Hier soll zunächst der Aufbau des Spektrometers betrachtet werden.

Um über den gesamten UV-Meßbereich eine gleichmäßig hohe Strahlungsdichteverteilung zu erreichen, wird die früher von uns benutzte Xenon-Hochdrucklampe (60) durch eine wassergekühlte 200W Deuteriumlampe⁹ (DL) ausgetauscht (Abb. 3.5 a,b). Die Deuteriumlampe hat im Vergleich zur Xenonlampe eine bedeutend geringere Emission im sichtbaren Spektralbereich. Durch Vergleich der Messung der Transmission des Kantenfilters WG9¹⁰, das bei 340 nm nach Hersteller Angaben noch 5 % Transmission aufweist und oberhalb von 400 nm praktisch vollständig durchlässig ist (Abb. 3.5 c,d) wird deutlich, daß ein Fehlstrahlungsanteil aus dem Spektralbereich oberhalb von 400 nm bei der Deuteriumlampe im Meßbereich praktisch nicht vorhanden ist (<0.2%). Der Schätzwert der relativen Standardabweichung, der aus 100 Spektren ermittelt wurde, zeigt außerdem, daß die Stabilität der Deuteriumlampe besser ist als die der Xenonlampe (Abb. 3.5 e,f). Die Deuteriumlampe bietet deshalb die besseren Voraussetzungen als Strahlungsquelle für das Diodenarrayspektrometer bei Messungen im UV-Bereich.

⁹Typ D 200 F, Hanau Quarzlampen GmbH, Hanau

¹⁰Schott Glaswerke, Mainz

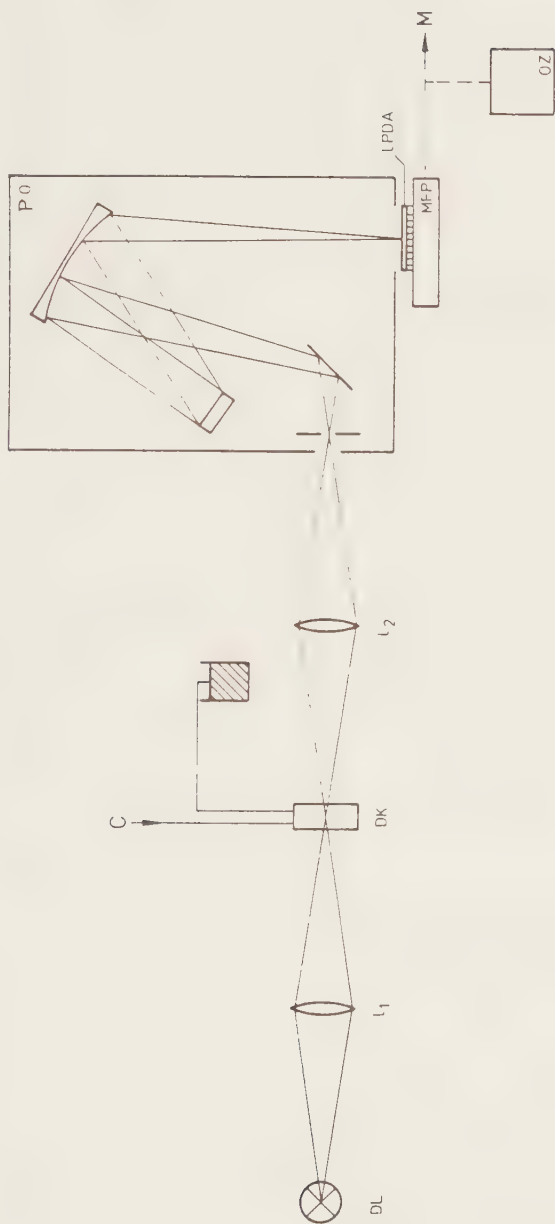


Abb. 3.4 schematischer Aufbau des Diodenarray-Spektrometers
(Erläuterung der Abkürzungen im Text)

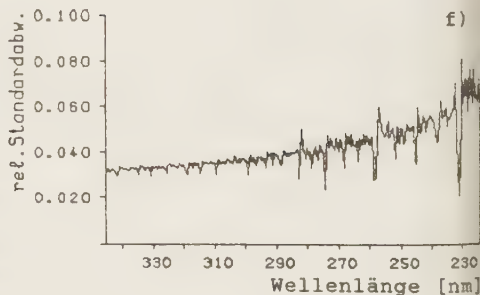
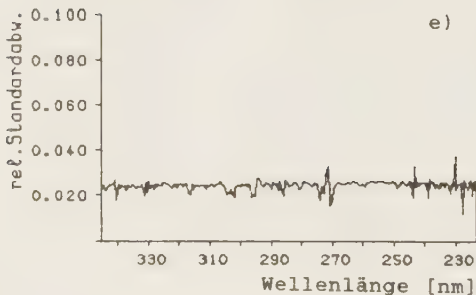
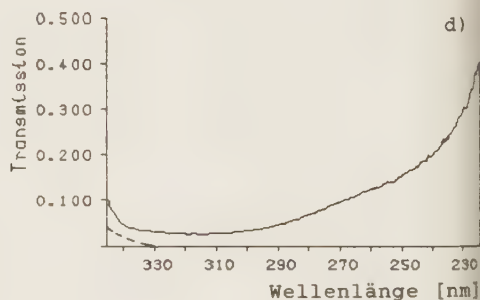
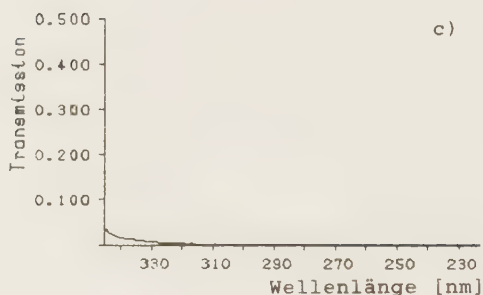
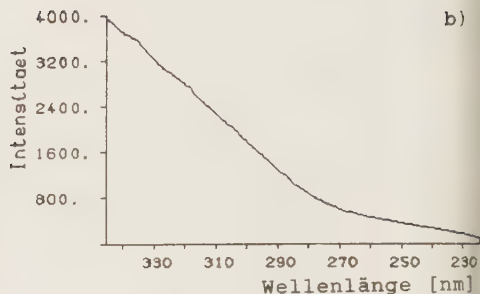
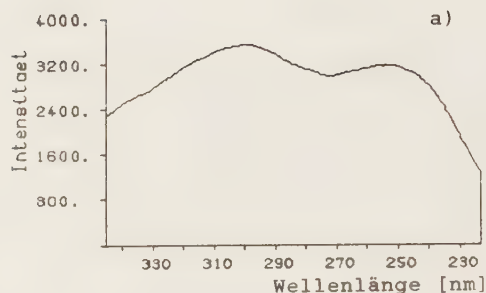


Abb. 3.5 Vergleich der Strahlungsquellen Deuteriumlampe (a,c,e)
 Xenonlampe (b,d,f)
 a,b) Strahldichtevertelung
 c,d) gemessene Transmission des Kantenfilter WG9
 Deuteriumlampe (c)
 Xenonlampe (d) mit wahrer Transmission des WG9 ---
 e,f) relative Standardabweichung der
 Strahldichtevertelung

Der Entladungsbogen der Deuteriumlampe mit 1 mm Durchmesser wird durch Fokussierung mit einer Quarzlinse (L_1 , $f=76.9$ mm, $d=18$ mm) in der Durchflußküvette¹¹ (DK) abgebildet. Um die Apertur der Küvette auf die Größe des Eintrittspaltes und des Gitters im Polychromator (PO) abzustimmen, wird eine spaltähnliche Geometrie für die Apertur gewählt. Die Küvette mit Edelstahlkapillaren als Zu- und Ableitungen hat bei einer Schichtdicke von 10 mm und einer Apertur von 3.5 mm Höhe und 1 mm Breite ein Volumen von 35 μ l. Durch eine zweite Quarzlinse (L_2) (Dimension wie erste Linse) wird eine 1:1-Abbildung des Entladungsbogens auf dem Eintrittsspalt des Polychromators (2.5 mm hoch, 0.24 mm breit) erreicht. Die Stellung des Gitters im Polychromator¹² kann durch eine Vorrichtung verändert werden und bestimmt so den auf den Detektor fallenden Spektralbereich. Bei einem holographischen Gitter mit 600 Linien pro Millimeter beträgt der von den 512 Dioden erfaßte Spektralbereich 120 nm (60). In der Fokalebene des Polychromators befindet sich das lineare Photodiodenarray¹³ (LPDA) mit einer photoempfindlichen Fläche von 12.8 mm $\cdot$ 2.5 mm. Das Photodiodenarray ist auf der Meßwerterfassungsplatine¹⁴ (MEP) befestigt, die die Steuerlogik zum Betreiben des linearen Photodiodenarray enthält und ein Videosignal erzeugt, das digitalisiert wird. Das Videosignal wird auf einem Oszilloskop (OZ) als Intensitätsspektrum gegen die Zeit dargestellt.

¹¹ Typ 178.30-Qs, Hellma GmbH & Co., Müllheim, Baden

¹² Monochromator des UV/VIS-Spektrometers 550 ohne Austrittsspalt, Bodenseewerk Perkin Elmer, Überlingen

¹³ RL 512S, Reticon Corporation, Sunnyvale, California

¹⁴ RC 1024SA, Reticon Corporation, Sunnyvale, California

3.3 Datenerfassung und Datenverarbeitung auf dem Mikroprozessor 8080

Das gesamte Mikroprozessorsystem mit den peripheren Geräten ist im Blockdiagramm in Abb. 3.6 dargestellt. Die Meßwerterfassung des Spektrometers ist vollständig autark, so daß das Mikroprozessorsystem keine steuernden Funktionen übernimmt. Nach der Digitalisierung des Videosignals im A/D Wandler¹⁵ wird das 12 bit-Videosignal über eine parallele Schnittstelle (8255/1) eingelesen. Um auch eine Akkumulation von Spektren durchführen zu können, ist für jeden Meßwert ein Speicherplatz von 24 Bit in der Erfassungsdatei vorgesehen. Das Mikroprozessorsystem SBC 80/10¹⁶ enthält eine 8080 Zentraleinheit (8 Bit). Zur Speicherung von Programmen wie dem Monitorprogramm, dem Meßwerterfassungsprogramm, der Bibliothek für mathematische Operationen und weiteren kleineren Programmen stehen 24 k EPROM¹⁷ zur Verfügung. Zur Spektrenspeicherung werden von den 21 k RAM¹⁸ 18 k RAM benutzt, so daß bei 512 Werten zu je 2 Byte pro Spektrum 18 Spektren auf dem Mikroprozessor gespeichert werden können. Weiterer Speicherplatz wird für die Erfassungsdatei, die Untergrunddatei und den Stackpointer benötigt.

Die Kommunikation mit dem Mikroprozessor erfolgt über eine serielle 20 mA Schnittstelle über eine Konsole. Das Startsignal, mit dem die Schieberegister im Array gestartet werden, wird durch die Untersetzung von einem dem Clocksignal abgeleiteten Signal eines 4 bit-Zählers, der sich auf der Meßwerterfassungsplatine befindet, in einer Teilerkette erzeugt. Das Untersetzungsverhältnis kann einmal manuell

¹⁵ADC 80 AG, Burr Brown RCORP, Stuttgart

¹⁶Intel Corporation, Santa Clara, California

¹⁷Erasable Programmable Read Only Memory

¹⁸Random Access Memory

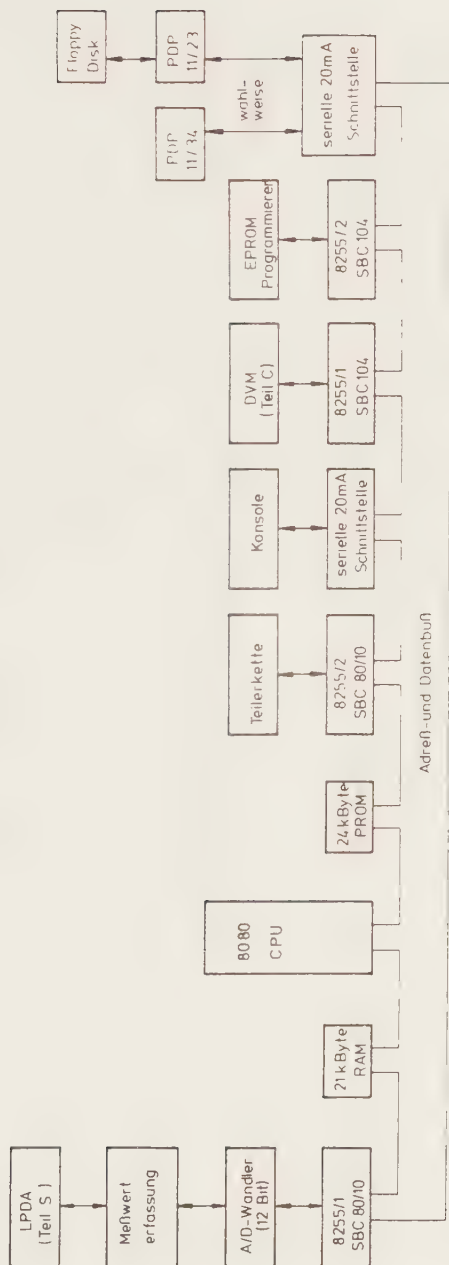


Abb. 3.6 Blockdiagramm des Mikroprozessorsystems mit peripheren Geräten (teilweise aus (7) übernommen)

durch eine bestimmte Schalterkombination oder bei automatischen Betrieb durch eine entsprechende Eingabe vom Mikroprozessor vorgegeben werden. In Abb. 3.7 ist das Zeitablaufdiagramm wiedergegeben. Ein Startsignal erfolgt, wenn eine entsprechende Anzahl von Impulsen, die von der Teilerkette vorgegeben werden, gezählt worden ist. Die Zeit zwischen zwei Startsignalen entspricht der Integrationszeit. Durch die Untersetzung des Zählers kann die Zeit zwischen zwei Startimpulsen zwischen 53.6 ms als minimale Integrationszeit, so daß alle 512 Dioden ausgelesen werden können, und 13.1 sek frei gewählt werden. Die Auslesezeit für die 512 Dioden, deren ungeradzahlige und geradzahlige Dioden abwechselnd ausgelesen werden, ist konstant, nur die Zeit für die Dunkelphase des Videosignals variiert. Die Dioden werden nicht gleichzeitig ausgelesen, aber die Belichtungszeit, in der die den Dioden parallel geschalteten Kondensatoren durch Photonen und Dunkelstrom entladen werden, ist für alle Dioden gleich.

Auf einer Erweiterungsplatine SBC 104 sind zwei weitere parallele Schnittstellen und ein serielle Schnittstelle, die zur wahlweisen Kopplung des Mikroprozessors mit dem Auswerterechner (PDP 11/23) oder einem anderen Kleinrechner (PDP 11/34) benutzt werden kann. Auf der PDP 11/34 werden die Programme für den 8080 in Intel-Assemblersprache erstellt und von einem Assembler-Programm in Maschinensprache übersetzt und anschließend in den RAM-Bereich des Mikroprozessors mit einem Offset für die Speicheradresse übertragen. Die Programmierung von EPROMs erfolgt dann durch cyclische Ausgabe der binär-kodierten Befehlssätze über einen parallelen Port zu einem EPROM-Programmiergerät.

Die zweite parallele Schnittstelle fragt den Wert des Spektralphotometers ab. Dabei wird nach jedem Spektrum, das von dem linearen Photodiodenarray in die Speicherdatei eingelesen wurde, ein Wert im BCD-Code übernommen und auf die Adresse der 512. Diode geschrieben. Da die Speicherkapa-

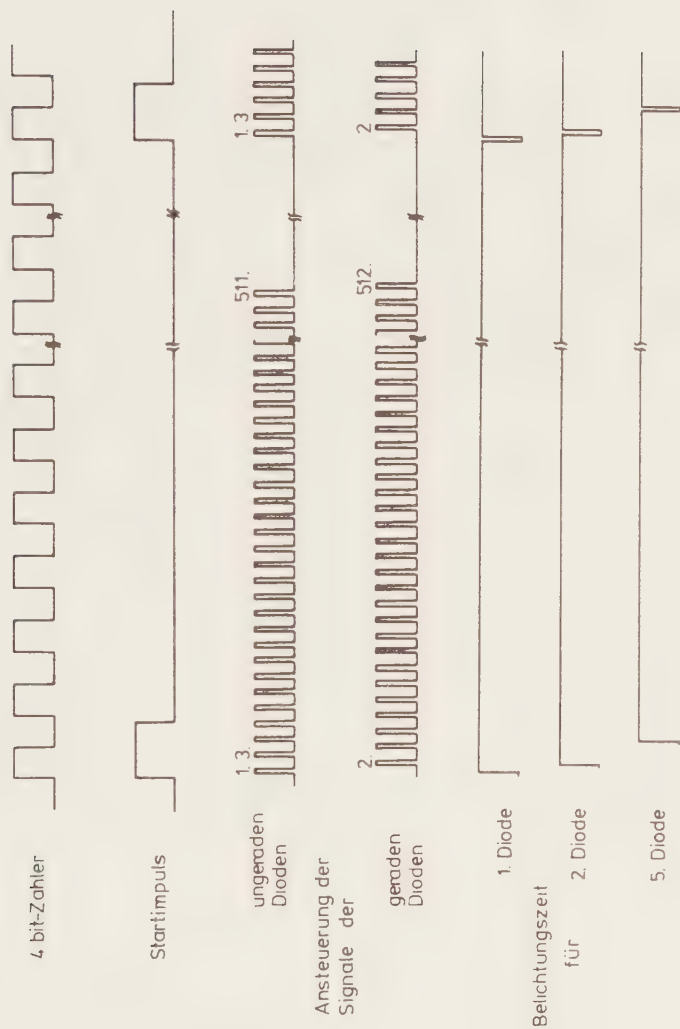


Abb. 3.7 Zeitablaufdiagramm zur Datenerfassung

zität des Mikroprozessorsystems begrenzt ist, wird das Spektrum bei der Registrierung von Chromatogrammen vor der Aufnahme des nächsten Spektrums auf den Auswerterechner übertragen. Die Übertragung von Spektren erfolgt seriell mit 9600 baud.

Das Meßwerterfassungsprogramm stimmt im wesentlichen mit dem von Jacob (7) beschriebenen Programm überein. Der schematische Ablauf ist in Abb. 3.8 wiedergegeben. Bei der Eingabe der Meßparameter wird festgelegt, ob DVM-Werte übernommen werden sollen und ob eine Datenübertragung zum Auswerterechner stattfindet. Die Teilerkette kann durch ein entsprechendes 16 bit-Datenwort programmiert werden und legt somit die Integrationszeit fest. Der Zeitbedarf für ein Spektrum hängt von der Scananzahl, dem Intervall zwischen zwei Spektren, der Integrationszeit und der Übertragungszeit für ein Spektrum ab. Da diese Größen während einer Messung nicht verändert werden, ist die Zeitachse durch die Spektrennummern definiert. Die Speicherung der Konstanten für die Spektrenanzahl wurde von 8 Bit auf 16 Bit erhöht, so daß statt 255 bis maximal 65535 Spektren innerhalb eines Chromatogramms übertragen werden können.

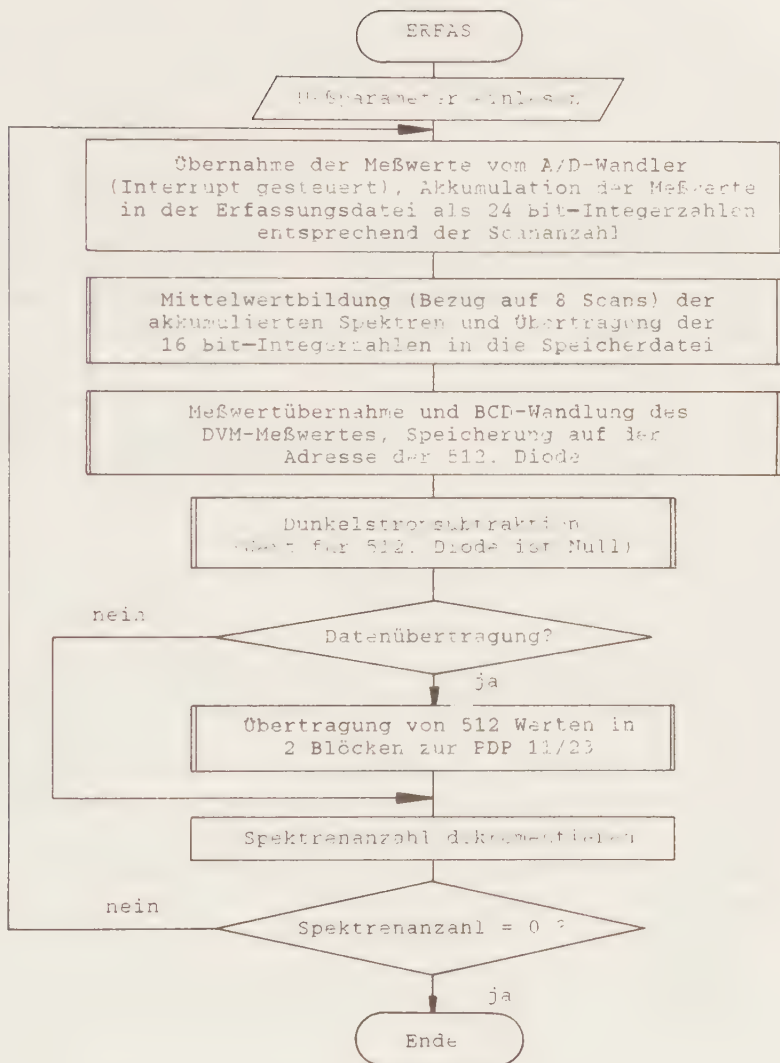


Abb. 3.8 Flußdiagramm des Meßwerterfassungsprogramms ERFAS

4 Kenngrößen des Diodenarray-Spektrometers

4.1 Dunkelstromverhalten

In allen Dioden fließen auf Grund von Leckwiderständen auch im unbelichteten Zustand geringe Ströme gegen die Sperrrichtung und verringern die Ladung der Kondensatoren. Zusätzlich tritt ein Schaltrauschen durch kapazitive Kopplung an den Videoausgängen auf. Der Dunkelstrom setzt sich aus den Leckströmen der einzelnen Dioden und dem Schaltrauschen zusammen. Durch Differenzbildung der Signale der Dummydioden und der aktiven Photodioden werden diese Einflüsse auf das Videosignal nur teilweise kompensiert, da diese Größen für jede einzelne Dioden charakteristisch sind.

Der Dunkelstrom, der nach der Subtraktion der Signale noch vorhanden ist, hat bei konstanter Temperatur und Integrationszeit (s. Kap.4.3) ein feststehendes Muster (fixed pattern output), so daß der Beitrag des Dunkelstroms zum Meßsignal durch Subtraktion des Dunkelstroms eliminiert werden kann. Zusätzlich ist jedoch auch der Dunkelstrom von einem statistischem Rauschen überlagert, das durch Schrot-rauschen, Verstärkerrauschen und Reset-Rauschen beim Auslesen der einzelnen Dioden hervorgerufen wird. Durch eine Akkumulation des Dunkelstroms kann dieses Rauschen verringert werden. Die Abhängigkeit der Standardabweichung des Dunkelstroms von der Akkumulationsrate wird durch die Auftragung der Standardabweichung gegen $1/\sqrt{n}$ (n = Akkumulationsrate 1...64) gezeigt (Abb. 4.1) und somit das $\sqrt{n}$ -Gesetz bestätigt.

Die Meßwerterfassung der gerad- und ungeradzahligen Dioden des Photodiodenarrays erfolgt über zwei getrennte Kanäle, bevor sie zu einem Videosignal vereinigt werden. Dadurch kann es zu unterschiedlichem Verhalten der gerad- und der

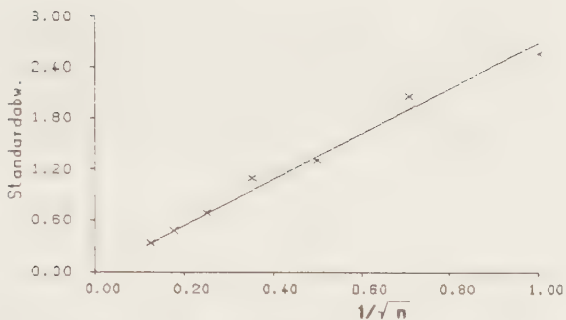


Abb. 4.1 Abhängigkeit der Standardabweichung des Dunkelstroms des Diodenarrays von der Akkumulationsrate n

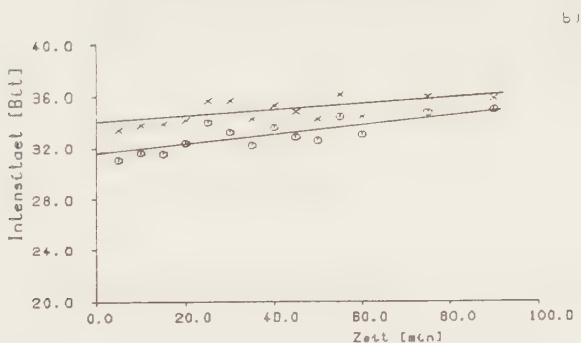
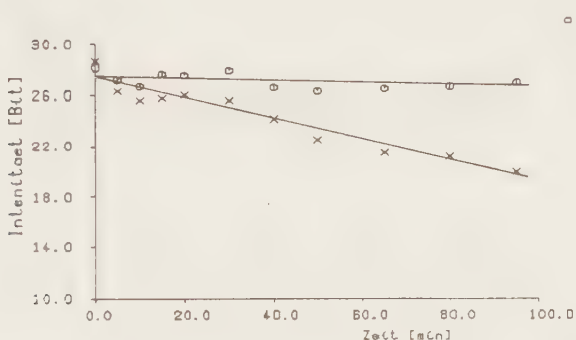


Abb. 4.2 zeitliche Änderung des Dunkelstroms des Diodenarrays als Mittelwert über
 x - alle geradzahligen
 o - alle ungeradzahligen Dioden
 a) nach 3 Stunden
 b) nach 30 Stunden Warmlaufzeit

ungeradzahligen Dioden bei der Auswertung kommen. Aus diesem Grund wird das Verhalten der beiden Diодengruppen in Abhängigkeit von der Einschaltdauer beobachtet¹. In Abb. 4.2a wird die Änderung des Dunkelstroms (als Mittelwert über alle gerad- bzw. ungeradzahligen Dioden) mit der Zeit (nach 3 Stunden Warmlaufzeit) getrennt dargestellt. Die geradzahligen Dioden zeigen eine stärkere Drift des Signals. Bei den ungeradzahligen bleibt das Signal nahezu konstant. Bei längerer Einschaltdauer (über Nacht nicht ausgeschaltet) zeigt sich, daß sich das Signal der geradzahligen Dioden kaum noch verändert, das Signal der ungeradzahligen Dioden jedoch stärker driftet (Abb. 4.2b). Da jedoch zum Zünden der Lichtquelle das Array ausgeschaltet werden mußte, da hierbei eine hohe Zündspannung auftritt, kann das Array nicht ständig durchlaufen. Deshalb wurde untersucht, ob durch eine lineare Interpolation die Drift der Dioden ausgeglichen werden kann. Die Standardabweichung, die aus 60 Spektren (Kap.4.2) bestimmt wurde, wurde durch lineare Interpolation des Dunkelstroms verringert. Dabei wurde zu jedem Spektrum ein neues Dunkelstromspektrum berechnet. Die Differenz der beiden Standardabweichungen ist in Abb. 4.3 dargestellt. Durch den F-Test wurde überprüft, ob dieser Unterschied signifikant ist. Es wurde die Varianz über alle 512 Dioden gebildet. (Ein Verzeichnis der Abkürzungen ist im Anhang A5 aufgeführt.)

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} = 1.23$$

Da $F(0.90, \infty, \infty) = 1.0$ (die Anzahl der Freiheitsgrade beträgt

¹ Jacob (7) hatte eine starke Drift der geradzahligen Dioden beobachtet, und daher nur die ungeradzahligen Dioden nach der Meßwerterfassung verwendet. Nach einer Reparatur des Arrays stehen wieder alle 512 Dioden zur Verfügung.

$f=30208 \approx \infty$) kleiner ist als der berechnete Wert, muß die Nullhypothese $s_1^2 = s_2^2$ abgelehnt werden. Durch lineare Interpolation des Dunkelstroms wird die Standardabweichung der Intensitätsspektren untereinander signifikant verringert.

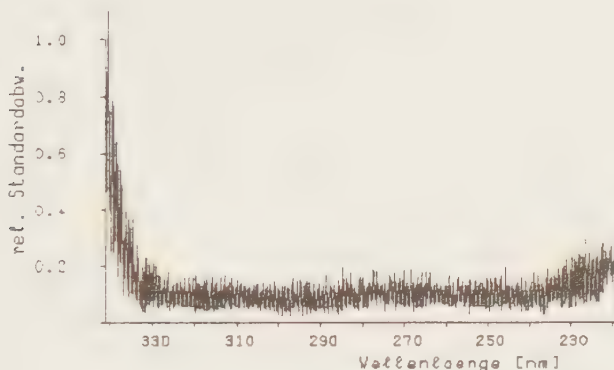


Abb. 4.3 Unterschied der relativen Standardabweichung der Intensitätsspektren bestimmt aus 60 Spektren Δs_1

$$\Delta s_1 = \frac{s_{1,a} - s_{1,b}}{s_{1,b}}$$

$s_{1,a}$ - Standardabw. aus 60 Spektren mit Subtraktion des Dunkelstroms, der vorher gemessen wurde

$s_{1,b}$ - Standardabw. aus 60 Spektren mit Subtraktion eines zu jedem einzelnen Intensitätsspektrum durch lineare Interpolation bestimmten Dunkelstromspektrums

4.2 Stabilität der Lichtquelle

Bei der Aufzeichnung von Chromatogrammen mit einem Einstrahlgerät und anschließende Berechnung der Extinktion mit einem I_0 -Spektrum, das bereits 1 bis 2 Stunden vorher aufgezeichnet wurde (s. Kap. 6), spielen die Drift und Fluktuation der Lichtquelle eine große Rolle. Die Fluktuationen äußern sich in kurzzeitigen Schwankungen der Strahl-

dichteverteilung. Die Drift der Lichtquelle bedeutet eine Veränderung der Strahldichteverteilung, die nur bei Langzeitmessungen festgestellt werden kann. Zur Betrachtung der Fluktuationen werden 100 Spektren im Abstand von 3 Sekunden innerhalb von ca. 4 Minuten aufgezeichnet. Die relative Standardabweichung über diese 100 Spektren ist in Abb. 4.4a dargestellt. Im Vergleich dazu ist die Standardabweichung der gleichen Lichtquelle bei Langzeitmessungen - 60 Spektren in ca. 200 Minuten, $\Delta t = 3.2 \text{ min}$ - um den Faktor 2 größer (Abb. 4.4b). Als Mittelwert ergibt sich für die relative Standardabweichung der Strahldichteverteilung der Lichtquelle ca. 0.4 % bei Langzeitmessungen. Die unterschiedliche Standardabweichung in Abhängigkeit von der Wellenlänge wurde nicht weiter untersucht. Das Rauschen der Dioden kann jedoch bei energiereicher Strahlung erhöht sein. Durch die längere Bestrahlungsdauer bei Langzeitmessungen kann das Verhalten der Dioden in Bezug auf das thermische Rauschen verändert werden.

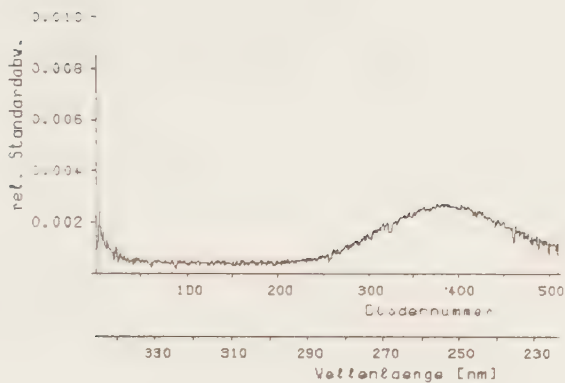
Um diesen Einfluß der Lichtquelle auf den Meßwert (Extinktion) zu verringern, werden Ausgleichsrechnungen durch Vergleich der Veränderung der Intensität bei anderen Wellenlängen durchgeführt. Dazu werden zunächst die prozentualen Veränderungen der Intensität I_{ij} bei einer Diode als Querschnitt über die Zeit beobachtet. Dabei dient der Mittelwert $\bar{I}_j$ über den gesamten Zeitraum als Bezugswert. Die relative Änderung der Intensität ΔI_{ij} für die Diode 300 ist in Abb. 4.5a dargestellt.

$$\Delta I_{ij} = \frac{I_{ij} - \bar{I}_j}{\bar{I}_j} \quad (4.1)$$

I - Intensität

j - Diodennummer

i - Spektrennummer (Zeit)



b)

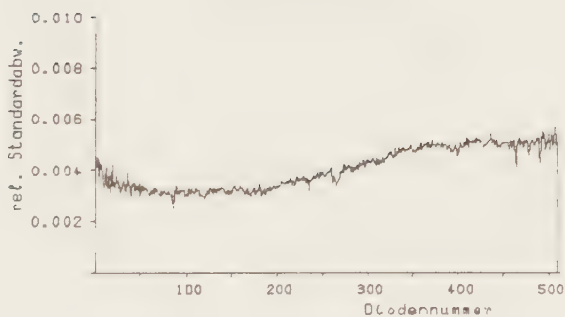


Abb. 4.4 relative Standardabweichung der Intensitätsspektren bestimmt aus
 a) 100 Spektren mit $\Delta t = 3$ sec zwischen 2 Spektren
 b) 60 Spektren mit $\Delta t = 3.2$ min zwischen 2 Spektren

Während des Beobachtungszeitraum verändert sich die Strahldichte-
 verteilung an diesem Meßpunkt maximal um ca. 2 %. Wenn
 die prozentuale Änderung der Intensität innerhalb eines
 Spektrums über den gesamten Meßbereich gleich ist, kann
 durch den Vergleich des Strahlungsdichte-veränderung $\overline{\Delta I_{1,j}}$
 bei anderen Dioden eine Korrektur durchgeführt werden.

$$\Delta \Delta I_{1,j} = \Delta I_{1,j} - \overline{\Delta I_{1,j}} \quad (4.2)$$

J - Diodenbereich, über den innerhalb
 eines Spektrums der Mittelwert über
 die relative Änderung der Intensität
 gebildet wird

Wenn man als Vergleich die Änderung der Strahldichte-
 verteilung der benachbarten Dioden (von Diode 250 bis Diode 349)
 heranzieht, kann die Drift der Intensität korrigiert werden
 (Abb. 4.5b), $\Delta \Delta I_{1,j}$ ist annähernd gleich Null. Eine Korrektur
 durch Vergleich der prozentualen Änderung der Strahldichte-
 verteilung über einen Wellenlängenbereich, der diese Meß-
 stelle nicht einschließt (von Diode 1 bis Diode 100) kann
 nur teilweise erfolgen (Abb. 4.5c). Doch auch hier werden
 die Fluktuationen zum Teil ausgeglichen, so daß durch den
 Anfangsbereich des Spektrums eine teilweise Korrektur der
 Fluktuationen im kurzwelligeren Bereich stattfinden kann.
 Durch thermische Änderungen der Lichtquelle ändert sich
 jedoch auch die spektrale Zusammensetzung der Strahldichte-
 verteilung, so daß ein Abgleich aus dem langwelligen Spek-
 tralbereich nicht vollständig auf den kürzerwelligen Bereich
 übertragen werden kann.

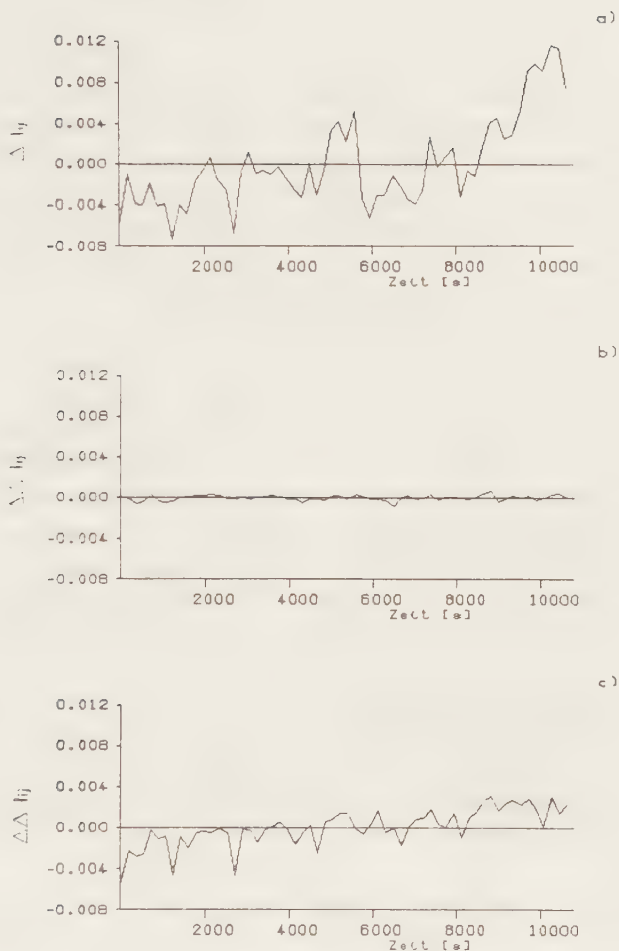


Abb. 4.5 Zeitliche Änderung der Intensität der Diode 300 des Diodenarrays

- a) relativ im Vergleich zum Mittelwert über die Beobachtungszeit
- b) Werte aus a) korrigiert durch die relative Änderung der Nachbardioden (250-349)
- c) Werte aus a) korrigiert durch die relative Änderung der Dioden an der langwelligeren Grenze des Meßbereichs

4.3 Abhängigkeit des Signals von der Integrationszeit

Der Entladungszustand der Speicherkondensatoren hängt von der Intensität der Strahlung und von der Belichtungszeit (Integrationszeit) der einzelnen Dioden ab. Meßgröße ist jedoch nicht direkt die Abnahme der Ladung der Speicherkondensatoren. Die Speicherkondensatoren werden wieder auf die Ladung Q_0 aufgeladen. Der dabei fließende Strom wird integriert und lädt den Kondensator eines Sample-and-Hold-Gliedes auf die Spannung U auf. Diese Spannung ist die eigentliche Meßgröße. Die Entladung der Speicherkondensatoren wird einmal durch die auftreffende Strahlung (Nutzsignalanteil) und durch Leckströme, die auch als Dunkelstrom bezeichnet werden, hervorgerufen. Das Signal sollte proportional mit der Integrationszeit zunehmen. Die Entladung durch den Dunkelstrom ist jedoch vom Ladungszustand des Speicherkondensators abhängig, so daß das reine Dunkelstromsignal größer ist als das Dunkelstromsignal bei gleichzeitiger Entladung durch Photonen. Durch einfache Dunkelstromsubtraktion - der Dunkelstrom wird jeweils zuvor bei gleicher Integrationszeit bestimmt - wird daher besonders bei Integrationszeiten oberhalb von 400 msec eine Abweichung von der Geraden festgestellt, wenn man das Intensitätssignal-Dunkelstrom gegen die Integrationszeit aufträgt (Abb.4.6).

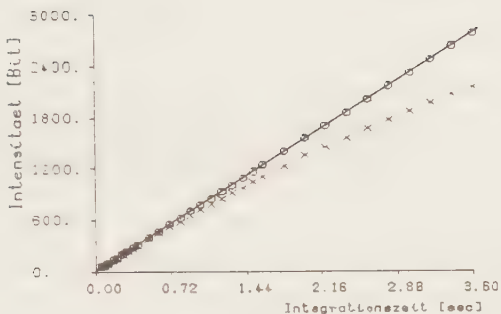


Abb. 4.6 Bestimmung des Nutzsignals jeweils für Diode 10
 x - Subtraktion des Dunkelstroms
 o - Korrektur des Dunkelstroms (siehe Kap. 4.3.2)

4.3.1 Dunkelstromsignal

Zunächst soll einmal das reine Dunkelstromsignal betrachtet werden. Das Signal, das durch den Dunkelstrom hervorgerufen wird, kann durch die Entladung Q eines Kondensators beschrieben werden.

$$\frac{dQ}{dt} = - \frac{1}{\tau} Q = - \frac{1}{\tau} Q_0 \exp\left(- \frac{t}{\tau}\right) \quad (4.3)$$

τ - Zeitkonstante

Q_0 - Ladung des Kondensators bei $t=0$

Da die Meßgröße jedoch die Spannung des Kondensators eines Sample-and-Hold-Gliedes, die bei der Aufladung der Speicherkondensatoren erzeugt wird, ist, gilt für das Signal des Dunkelstroms S_d :

$$S_d = S_0 \left(1 - \exp \left(- \frac{t}{\tau} \right) \right) + a \quad (4.4)$$

S_0 - Signal bei unendlicher Integrationszeit

a - auf den Zeitpunkt $t=0$ extrapolierte Größe der Restentladung der Kondensatoren

Dabei wird eine endliche Signalgröße a für Integrationszeit Null angenommen. Mit dieser Gleichung kann das reine Dunkelstromsignal S_d in Abhängigkeit von der Integrationszeit t berechnet werden, wenn man davon ausgeht, daß S_0 , τ und a spezifische Konstanten für jede einzelne Diode sind. Die Bestimmung der Parameter mit Hilfe einer Meßreihe (Dunkelstrommessungen bei unterschiedlichen Integrationszeiten) wurde auf zwei verschiedenen Wegen durchgeführt:

1. Optimierung der Anpassung der Meßwerte an die Gleichung 4.4 durch das Simplex-Verfahren nach Nelder und Mead (62,63)
2. Eindimensionales Anpassungsverfahren mit eines Algorithmus, bei dem nach geeigneter Substitution der Normalgleichungsmatrix eine iterative Bestimmung des Parameter durchgeführt werden kann. Diese Verfahren wurde bereits von Wiecken (64) nach einer Vorlage von Stevens durchgeführt.

Simplex-Verfahren

Das Simplex-Verfahren nach Nelder und Mead ist eine Suchmethode zur Bestimmung der Parameter. Es werden für n Parameter zunächst $n+1$ Eckpunkte eines n -dimensionalen Polygons (Simplex) gebildet. Zu jedem Parametersatz wird entsprechend der Gleichung 4.4 ein Wert für S_d berechnet und mit dem gemessenen Signal verglichen.

$$\sum_1 (S_{d1,ber.} - S_{d1,gem})^2 = F = \text{Zielfunktion} \quad (4.5)$$

Die Größe der Zielfunktion soll minimiert werden, sie ist ein Maß für die Anpassung. Die Anzahl der Parametersätze ist um eins größer als die Anzahl der Parameter. Der jeweils schlechteste Wert (Parametersatz mit der größten Zielfunktion) wird verworfen. Neue Parametersätze, die als Punkte im n-dimensionalen Raum dargestellt werden können, können durch Reflexion, Expansion oder Kontraktion erzeugt werden. Der Wert der neuen Zielfunktion bestimmt dann, mit welcher Operation ein neuer Punkt erzeugt wird. Das Abbruchkriterium des Bestimmungsverfahrens ist die Standardabweichung der Zielfunktion der n+1 Parametersätze (62). Wenn diese kleiner als eine vorgegebene Größe ist, wird das Optimierungsverfahren beendet und der Parametersatz des besten Punktes als Ergebnis ausgegeben.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^{n+1} (F(x_j) - \bar{F})^2}{n}} \quad (4.6)$$

$$\text{mit } \bar{F} = \frac{1}{n+1} \sum_{j=1}^{n+1} (F(x_j)) \quad (4.7)$$

n - Anzahl der Parameter

n+1 - Anzahl der Parametersätze

Da die Optimierung nach einem Suchalgorithmus erfolgt, ist der Zeitbedarf für die Bestimmung der Parameter einer Diode entsprechend groß (90 sec bei $s = 1 \cdot 10^{-6}$).

Asymptotische Regression

Nach dem Verfahren von Stevens, das eine Variante des Gauß-Newton Verfahren darstellt, werden die partiellen Ableitungen nach den Konstanten gebildet und unter Eliminierung der Konstanten aus den ersten beiden Zeilen wird die Bestimmung der Nullstelle der Ableitung der 3. Zeile durchgeführt. Die Konstanten der Gleichung 4.4 sind optimal bestimmt, wenn die Summe der Abweichungsquadrate minimal ist.

$$\sum \delta_1^2 = \sum [S_0 (1 - \exp(-t_i/\tau)) + a - S_{d1}]^2 = \min \quad (4.8)$$

Nach der Substitution mit

$$Y_1 = S_1, \quad B = -S_0, \quad A = S_0 + a, \quad k = -1/\tau$$

vereinfacht sich die Gl. 4.8 nach

$$F = \sum \delta_1^2 = \sum [A + B \cdot \exp(t_i \cdot k) - Y_1]^2 = \min \quad (4.9)$$

Die Bedingung ist erfüllt, wenn die partiellen Ableitungen nach den Parametern Null sind:

$$\frac{\partial F}{\partial A} = 2 \sum [A + B \cdot \exp(t_i \cdot k) - Y_1] \cdot 1 = 0 \quad (4.10)$$

$$\frac{\partial F}{\partial B} = 2 \sum [A + B \cdot \exp(t_i \cdot k) - Y_1] \cdot \exp(t_i \cdot k) = 0 \quad (4.11)$$

$$\frac{\partial F}{\partial k} = 2 \sum [A + B \cdot \exp(t_i \cdot k) - Y_1] \cdot t_i \cdot B \cdot \exp(t_i \cdot k) = 0 \quad (4.12)$$

Durch Eliminierung von A und B aus den drei Gleichungen (4.10, 4.11 und 4.12) kann mit der resultierenden Gleichung iterativ ein Wert für $k = -1/\tau$ ermittelt werden. Mit der Substitution

$$z_1 = \exp(t_1 \cdot k) = \exp(-t_1 / \tau)$$

erhält man für A und B folgende Gleichungen als Funktion von z_1 :

$$A' = A \cdot D = \sum z_1^2 \sum Y_i - \sum z_1 \sum Y_i z_1 \quad (4.13)$$

$$B' = B \cdot D = n \sum Y_i z_1 - \sum z_1 \sum Y_i \quad (4.14)$$

$$\text{mit } D = n \sum z_1^2 - (\sum z_1)^2 \quad (4.15)$$

Aus Gl. 4.12 erhält man nach Multiplikation mit D^2

$$\sum (A' + B' z_1 - D Y_i) \cdot B' z_1 - t_1 = 0 \quad (4.16)$$

A' , B' und D werden durch die Gl. 4.13, 4.14 und 4.15 ersetzt, so daß als einziger Parameter $-1/\tau = k$ in z_1 bestimmt werden kann. Die Parameter S_0 und a können anschliessend mit Hilfe der Gleichungen 4.13 und 4.14 berechnet werden.

Der Zeitaufwand wird im Vergleich zur Bestimmung der Parameter mit dem Simplex-Verfahren um über eine Zehnerpotenz reduziert (6 Sekunden bei 20 Iterationsschritten), da nur ein Parameter iterativ bestimmt werden muß. Das Ergebnis ist bei beiden Verfahren identisch (Tab. 4.1). Die Parameter variieren auf Grund der unterschiedlichen Eigenschaften der gekoppelten Kondensatoren mit der Diodennummer (Abb. 4.7), so daß für jede einzelne Diode ein Parametersatz berechnet werden muß. Die Anpassung der gemessenen Werte an den berechneten Verlauf des Dunkelstroms in Abhängigkeit von der Integrationszeit ist in Abb. 4.8 dargestellt. Die relative Standardabweichung zum Beispiel für die Diode 10 beträgt 0.4 %.

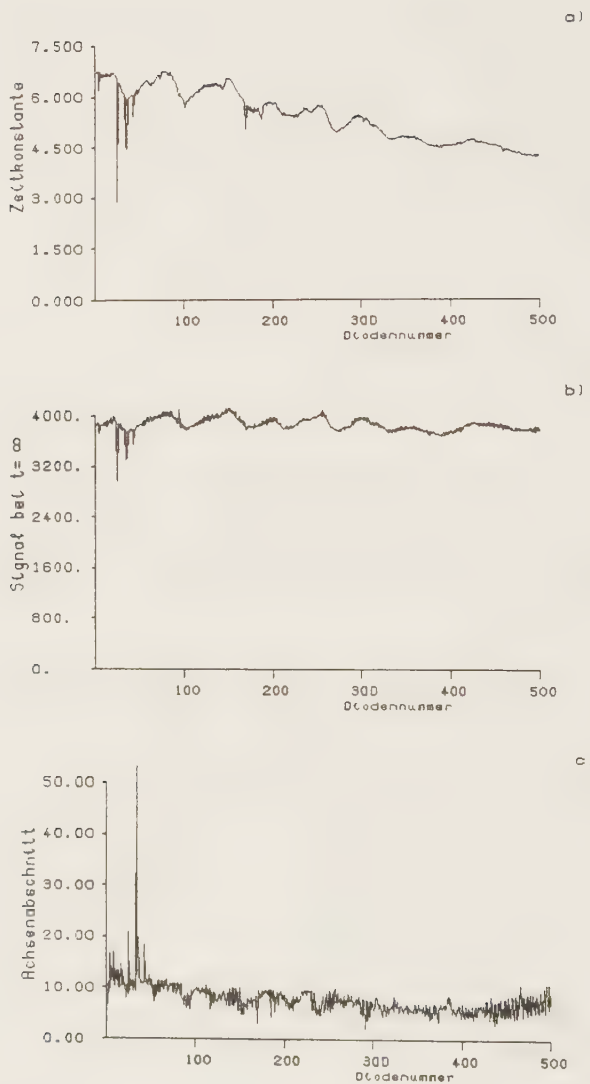


Abb. 4.7 Parameter des Dunkelstroms $S_d = S_0 (1 - \exp(-t/\tau)) + a$ des Diodenarrays in Abhängigkeit von der Diodennummer

- a) τ - Zeitkonstante
- b) S_0 - Dunkelstromsignal bei $t = \infty$
- c) a - Dunkelstromsignal bei $t = 0$

Diodennr.		asympt. Regression	Simplex-Verfahren
10	τ	6.66685	6.66684
	S_0	3854.326	3854.324
	a	10.325	10.325
366	τ	4.68309	4.68309
	S_0	3761.258	3761.257
	a	4.284	4.284

Tab. 4.1 Vergleich der Parameter des Dunkelstroms bestimmt durch asymptotische Regression bzw. mit dem Simplex-Verfahren exemplarisch für 2 Dioden

τ - Zeitkonstante
 S_0 - Dunkelstromsignal bei $t = \infty$
 a - Dunkelstromsignal bei $t = 0$

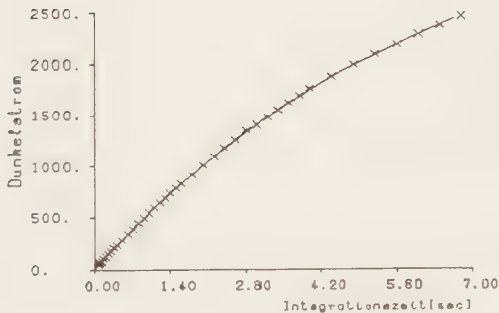


Abb. 4.8 berechneter Kurvenverlauf des Dunkelstroms bei Diode 10 des Arrays mit Meßwerten bei verschiedenen Integrationszeiten

4.3.2 Nutzsignal

Das gemessene Signal setzt sich aus dem Dunkelstromanteil und dem Nutzsignalanteil zusammen. Die Entladung der Kondensatoren durch Photonen ist proportional der Strahlungsmenge. Für das Nutzsignal S_N gilt entsprechend:

$$S_N = k \cdot t \quad (4.17)$$

Das Nutzsignal ist proportional zur Integrationszeit t . Für die Änderung des Gesamtsignals mit der Integrationszeit gilt:

$$\frac{dS_{ges}}{dt} = \frac{dS_d}{dt} + \frac{dS_N}{dt} = \frac{1}{\tau} (S_0 - S_d + a) + k \quad (4.18)$$

mit der Lösung

$$S_{ges} = S_0 (1 - \exp(-t/\tau)) + a + \tau \cdot k (1 - \exp(-t/\tau)) \quad (4.19)$$

Nach Einsetzen der Gl. 4.4 und 4.17 kann man die Gleichung nach S_N umformen

$$S_N = \frac{S_{ges} - S_d}{S_d - a} \cdot S_0 \cdot \frac{t}{\tau} \quad (4.20)$$

Da nach Gleichung 4.4

$$\tau = \frac{-t}{\ln \left(\frac{S_0 + a - S_d}{S_0} \right)} \quad (4.21)$$

ist, erhält man für S_N eine Gleichung

$$S_N = S_0 \left(1 - \frac{S_{ges} - a}{S_d - a} \right) \cdot \ln \left(1 - \frac{S_d - a}{S_0} \right), \quad (4.22)$$

mit deren Hilfe man das Nutzsignal aus dem gemessenen Signal S_{ges} und dem reinen Dunkelstromsignal S_d bei der entsprechenden Integrationszeit berechnen kann, wenn S_0 und a als Parameter des Dunkelstromverhaltens bekannt sind.

Durch reine Dunkelstromsubtraktion konnte keine lineare Beziehung zwischen Signal und Integrationszeit hergestellt werden (Abb. 4.6). Wird jedoch das Nutzsignals mit der Dunkelstromkorrektur berechnet, wird diese Proportionalität auch bei großen Integrationszeiten bestätigt (siehe Abb. 4.6). Man erkennt zusätzlich aus der Auftragung, daß bis zu einer Integrationszeit von ca. 400 ms sich die Werte, die mit Dunkelstromsubtraktion bzw. Dunkelstromkorrektur berechnet werden, kaum von einander unterscheiden. Die Dunkelstromsubtraktion kann im Rahmen der Meßgenauigkeit bei kurzen Integrationszeiten angewendet werden. Bei der kürzesten Integrationszeit von 53.6 ms, die bei den meisten Messungen benutzt wird, kann die Dunkelstromkorrektur durch die Dunkelstromsubtraktion ersetzt werden.

4.4 Fehlstrahlung

Das Licht, das nach der Zerlegung durch ein dispersives Element auf einen Detektor fällt, setzt sich aus dem Nutzlicht und der Fehlstrahlung zusammen. Dabei wird als Fehlstrahlung der Anteil des Signals definiert, dessen Wellenlängen außerhalb der Hundertstelwertbreite des Nutzsignals (b_{100}) liegt, so daß sich der Fehlstrahlungsanteil p bei der Wellenlänge λ_0 als Quotient aus Fehlstrahlung und Gesamtstrahlung ergibt:

$$p = \frac{\int_0^{\lambda_0-h} \Phi(\lambda) d\lambda + \int_{\lambda_0+h}^{\infty} \Phi(\lambda) d\lambda}{\int_0^{\infty} \Phi(\lambda) d\lambda} \quad (4.23)$$

mit $h = b_{100}/2$

$\Phi(\lambda)$ - effektive spektrale Gerätefunktion

Die effektive spektrale Gerätefunktion wird überwiegend von der Strahldichtevertellung der Lichtquelle und der spektralen Empfindlichkeit des Empfängers bestimmt, da diese beiden Funktionen stark mit der Wellenlänge variieren können (60). Die Fehlstrahlung kann bei Messungen in einem Wellenlängenbereich, der vom Maximum der Strahldichtevertellung der Lichtquelle weit entfernt ist, zu einer Verfälschung der Meßergebnisse führen, besonders dann, wenn der Empfänger in diesem Bereich eine hohe Empfindlichkeit aufweist. Der Fehlstrahlungsanteil kann in diesem Fall durch ein Filter verringert werden, das außerhalb des Nutzbereichs absorbiert. Eine effektivere Verringerung der Fehlstrahlung

wird durch Doppelmonochromatoren erreicht.

Bei der Vielkanaldetektion mit einem Polychromator ist jedoch die Verwendung von Doppelmonochromatoren nicht möglich. Die Fehlstrahlung wird hierbei zu einem besonderen Problem, da jedem einzelnen Detektorelement ein vergrößerter Raumwinkel zur Verfügung steht. In diesem Fall kann nur ein qualitativ hochwertiger Polychromator mit einer reduzierten Anzahl optischer Elemente - z.B. Verwendung eines konkav-holographischen Gitters - der Fehlstrahlungsanteil verringert werden.

4.4.1 Einfluß der Fehlstrahlung auf die Extinktion

Die Reintransmissionsgrad T einer Probe wird durch die in die Probe eintretende Strahlung I_0 und die aus der Probe austretende Strahlung I bestimmt.

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (4.24)$$

Übt jedoch zusätzlich die Fehlstrahlung I_f einen Einfluß auf die Größe des Intensitätssignals aus, erhält man als scheinbare Transmission der Probe T'

$$T' = \frac{I + I_f}{I_0 + I_f} \quad (4.25)$$

Diese Gleichung gilt jedoch nur, wenn die Fehlstrahlung durch die Probe nicht geschwächt wird. Der Fehlstrahlungsanteil p war ja bereits nach Gl. 4.23 definiert als

$$p = \frac{I_f}{I_0 + I_f}, \quad (4.26)$$

so daß Gl. 4.25 nach

$$T = \frac{T' - p}{1 - p} \quad (4.27)$$

umgeformt werden kann. Bei einem bekannten Fehlstrahlungsanteil p kann also unter der Voraussetzung, daß die Fehlstrahlung nicht durch die Probe geschwächt wird, aus der gemessenen Transmission T' der Reintransmissionsgrad T berechnet werden. Der Fehler in der Extinktion ΔE hängt von dem Fehlstrahlungsanteil p der Transmission der zu untersuchenden Probe ab.

$$\Delta E = E' - E = -\lg T' + \lg T = -\lg (1 - p + p/T) \quad (4.28)$$

Bei niedrigen Transmissionen (hohen Extinktionswerten) wird der Fehler am größten, so daß eine negative Abweichung vom Lambert-Beerschen Gesetz (Gl. 4.29) festgestellt werden kann.

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d = -\lg T \quad (4.29)$$

In Abb. 4.9 ist für unterschiedlich konzentrierte Phenanthren-Lösungen die Konzentrationsabhängigkeit der Extinktion bei verschiedenen Wellenlängen dargestellt. Die Abweichung von der Linearität ist deutlich zu erkennen. Da die Fehlstrahlung auch durch Filter nicht wesentlich reduziert werden konnte, bzw. kein geeignetes Filter für den Meßbereich (340 - 220 nm) zur Verfügung steht, wird im folgenden versucht, den Fehlstrahlungsanteil mit Hilfe verschiedener Modelle zu berechnen und zu berücksichtigen.

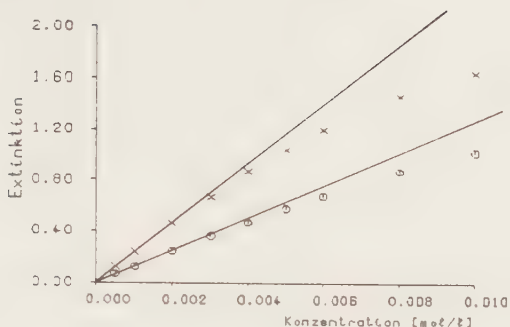


Abb. 4.9 Konzentrationsabhängigkeit der Extinktionsmessung von Phenanthren bei verschiedenen Dioden
 + - Diodennummer 70 (330 nm)
 o - Diodennummer 51 (334 nm)

4.4.2 Berechnung des Fehlstrahlungsanteils

Nach der Gl. 4.27 kann bei Kenntnis des Fehlstrahlungsanteils aus der gemessenen Transmission T' die wahre Transmission berechnet werden. Da der Fehlstrahlungsanteil p jedoch unbekannt ist, kann über die Abweichung vom Lambert-Beerschen Gesetz eine Bestimmung von p durch Iteration durchgeführt werden. Die Grundvoraussetzung ist hierbei, daß die Abweichung von der Linearität beim Lambert-Beerschen Gesetz alleine durch die Fehlstrahlung hervorgerufen wird. Es soll wiederum wie in Kap. 4.3 eine Minimalisierung der Abweichungsquadrate durchgeführt werden.

$$\sum_1^N \delta_1^2 = \sum_1^N [E_1 - \epsilon c_1 d]^2 = \text{Min.} \quad (4.30)$$

E_1 entspricht dem wahren Extinktionswert bei der Konzentration c_1 , der mit dem entsprechenden Fehlstrahlungsanteil aus der gemessenen Transmission berechnet wird, und $\epsilon c_1 d$ stellt die Geradengleichung dar, die aus allen E_1 -Werten berechnet wurde. Durch Iteration des Fehlstrahlungsanteils wird die optimale Anpassung berechnet, und der entsprechende Fehlstrahlungsanteil ausgegeben.

In erster Näherung wird davon ausgegangen, daß die Fehlstrahlung durch die Probe nicht geschwächt wird. Der Fehlstrahlungsanteil ist in diesem Fall eine Konstante und damit von der Konzentration unabhängig.

$$T = \frac{T' - A}{1 - A} \quad \text{Modell 1} \quad (4.31)$$

A - Fehlstrahlungsanteil

Es ist jedoch wahrscheinlich, daß auch die Fehlstrahlung durch die Probe geschwächt wird, da auch an anderer Stelle im Spektrum Absorption stattfindet, die bei der Beobachtungswellenlänge eine Veränderung der Fehlstrahlung verursacht. Dabei wird angenommen, daß die Schwächung der Fehlstrahlung durch eine Grauabsorption ($\epsilon_f = \text{konstant}$) hervorgerufen wird. Falls die Fehlstrahlung stark konzentrationsabhängig ist kann durch

$$T = \frac{T' - B \cdot c}{1 - B \cdot c} \quad \text{Modell 2} \quad (4.32)$$

B - Fehlstrahlungsanteil

eine Anpassung erreicht werden. Eine Kombination der beiden Modellvorschläge für den Fehlstrahlungsanteil ist

$$T = \frac{T' - A - B \cdot c}{1 - A - B \cdot c} \quad \text{Modell 3} \quad (4.33)$$

Durch eine Erhöhung der Parameteranzahl auf 3 sollte die Anpassung noch weiter verbessert werden.

$$T = \frac{T' - A - B \cdot c - BA \cdot c^2}{1 - A - B \cdot c - BA \cdot c^2} \quad \text{Modell 4} \quad (4.34)$$

Durch den F-Test soll anschließend das beste Modell zur Berechnung des Fehlstrahlungsanteils bestimmt werden.

Bei der Berechnung der Parameter werden zwei Verfahren angewandt:

1. Fibonacci-Suche, wenn nur ein Parameter bestimmt werden muß
2. Simplex-Verfahren nach Nelder und Mead bei 2 bzw. 3 Parametern (siehe Kap.4.3)

Die Fibonacci-Suche

Die Fibonacci-Suche kann als Alternative zur äquidistanten Suche eingesetzt werden, wenn das Minimum oder Maximum einer eindimensionalen Funktion bestimmt werden muß. Als sequentielle Optimierungsmethode werden die Ergebnisse früherer Bestimmungen für die weitere Annäherung an das Optimum verwertet. Die Grundlage der Fibonacci-Suche sind die Fibonacci-Zahlen F_i , die mit

$$(F_i)_n = \frac{1}{\sqrt{5}} \left[\left(\frac{1 + \sqrt{5}}{2} \right)^{n+1} - \left(\frac{1 - \sqrt{5}}{2} \right)^{n+1} \right] \quad (4.35)$$

$$n = 0, 1, 2, 3, \dots$$

berechnet werden können. Mit Hilfe der Fibonacci-Zahlen wird in einem Intervall (x_a, x_e) eine Iteration in n Schritten

durchgeführt. Dabei wird die Lage der neuen Punkte bei jedem Schritt durch die entsprechenden Fibonacci-Zahlen bestimmt. Die Genauigkeit mit der das Ergebnis dem Optimum angenähert werden kann, wird durch die Anzahl der Iterationsschritte festgelegt.

Der Fehlstrahlungsanteil, der auf diese Weise mit dem Modell 1 für eine Reihe von Phenanthren-Lösungen unterschiedlicher Konzentration über die Abweichung vom Lambert-Beerschen Gesetz berechnet wurde, ist in Abb. 4.10a dargestellt. Zur Absorptionskante des Phenanthrens (Abb. 4.10b) nimmt der Fehlstrahlungsanteil ab. Da das Phenanthren unterhalb von 300 nm (oberhalb Diode 200) einen hohen Extinktionskoeffizienten hat, wird alle Strahlung, deren Wellenlänge kleiner als 300 nm ist, absorbiert. Damit wird ausgeschlossen, daß Fehlstrahlung aus dem kurzwelligen Spektralbereich zur berechneten Fehlstrahlung beiträgt. Die hier dargestellte Fehlstrahlung kommt also überwiegend aus dem langwelligen Spektralbereich und aus dem Meßbereich (340 - 220 nm) selbst. In diesem Fall wird eine Fehlstrahlung bis zu 12 % berechnet. Der Durchschnitt liegt jedoch zwischen 3 und 1 % Fehlstrahlungsanteil.

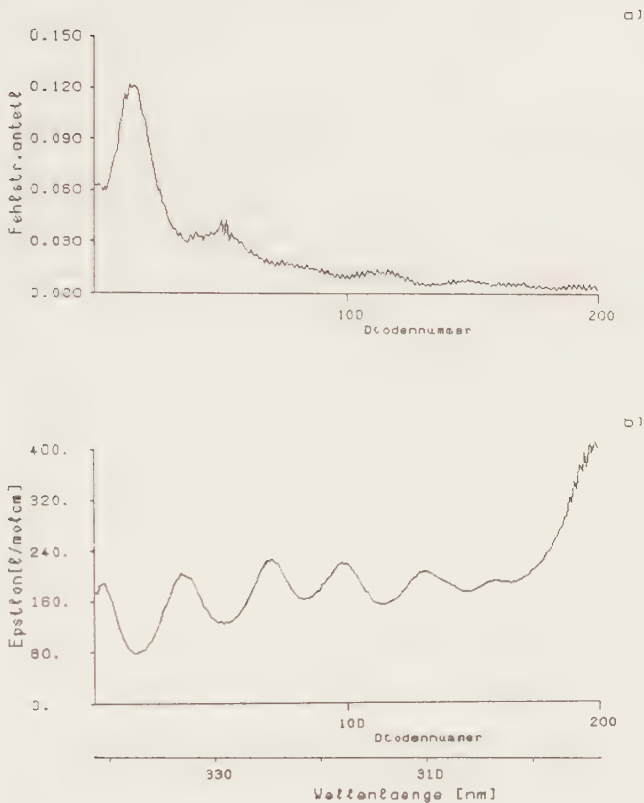


Abb. 4.10 Zum Fehlstrahlungsanteil bei Phenanthren
 a) Abhängigkeit des Fehlstrahlungsanteils von der Diodennummer (Wellenlänge) berechnet mit Modell 1 (Gl. 4.31)
 b) UV-Spektrum von Phenanthren

4.4.3 Auswahl eines geeigneten Modells zur Berechnung des Fehlstrahlungsanteils

Im allgemeinen gilt, daß durch eine Vergrößerung der Anzahl der Parameter m die Kurvenanpassung an die vorgegebenen Werte verbessert und die Summe der Abweichungsquadrate (4.30) verringert wird. Die Auswirkung der Korrektur auf die Extinktion durch die berechneten Fehlstrahlungsanteile mit den verschiedenen Modellen ist in Abb. 4.11 dargestellt.

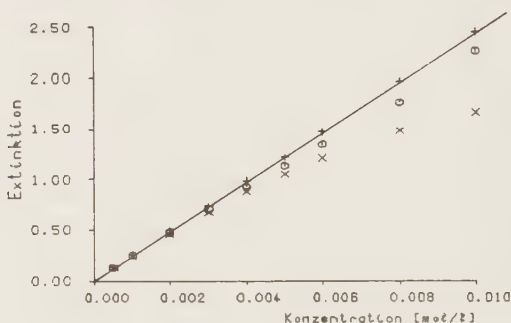


Abb. 4.11 Wirkung der mit den verschiedenen Modellen berechneten Fehlstrahlungsanteile auf die Extinktion von Phenanthren bei 330 nm
* - Meßwerte
o - Modell 1 (Gl. 4.31): $p = A$
+ - Modell 3 (Gl. 4.33): $p = A+B \cdot c$

Die Reststreuung R bietet eine Vergleichsmöglichkeit für die verschiedenen Modelle, da die Abweichung pro Freiheitsgrad betrachtet wird.

$$s_{y \cdot x} = \sqrt{\frac{\sum (Y_i - y_i)^2}{N - m}} \quad (4.37)$$

(N - m) - Anzahl der Freiheitsgrade

In Tab. 4.2 sind die Reststreuungen $s_{y \cdot x}$ als Regression von y auf x für die verschiedenen Modelle bei drei verschiedenen Meßstellen zusammengestellt. Bei den beiden Modellen mit einem Parameter - Modell 1 ($p=A$) und Modell 2 ($p=Bc$) - wird mit dem konzentrationsunabhängigen Fehlstrahlungsanteil eine bessere Anpassung erzielt. Die Reststreuung ist für das Modell mit den 3 Parametern am geringsten.

	$s_{y \cdot x}$			
Dioden nr.	Modell 1 $p = A$	Modell 2 $p = Bc$	Modell 3 $p = A+Bc$	Modell 4 $p = A+Bc+BAc^2$
36	0.0206	0.0282	0.0051	0.0045
70	0.0251	0.0333	0.0078	0.0048
132	0.0172	0.0186	0.0119	0.0099

Tab. 4.2 Reststreuung der um den Fehlstrahlungsanteil korrigierten Extinktionswerte $E = -\lg T = -\lg(T'-p)/(1-p)$

Durch den F-Test (Tab.4.3) kann jedoch gezeigt werden, daß kein signifikanter Unterschied zwischen den Modellen mit 2 bzw. 3 Parametern besteht, da die Nullhypothese in diesen Fällen nicht abgelehnt werden kann.

$$\hat{F} = \frac{s_1^2}{s_2^2} < F(f_1, f_2, 0.95) \quad (4.38)$$

Dioden nr.	$\hat{F}$		
	i = 1 p = A f ₁ = 8	i = 2 p = Bc f ₂ = 8	i = 3 p = A-Bc f ₃ = 7
36	21.2	39.7	1.29
70	27.0	47.4	2.63
132	3.00	3.53	1.44
F(0.95)	4.15	4.15	4.21

Tab. 4.3 F-Test $\hat{F} = \frac{s_1^2}{s_4^2}$ mit s_4 für Modell 4 mit
3 Parametern, $f_4 = 6$

Da in einem Fall auch kein Unterschied zwischen der Anpassung der korrigierten Werte durch Fehlstrahlungsanteile, die nach $p=A$ bzw. $p=A+Bc$ berechnet wurden, beobachtet wurde, wurde bei einer größeren Anzahl von Meßstellen ein Vergleich zwischen den beiden Modellen durchgeführt (Tab. 4.4). Es kann keine eindeutige Aussage gemacht werden, welche der beiden Modelle die bessere Anpassung bietet. Das Modell mit 2 Parametern wird überwiegend im Absorptionsmaximum bestätigt, da hier die gemessene Extinktion der Eichreihe (Abb. 4.12) dementsprechend groß ist.

Dioden nr.	$S_{y \cdot x1}$ [10 ⁻⁴]	$S_{y \cdot x2}$ [10 ⁻⁴]	$\hat{F}$ $f_1=8, f_2=7$
4	3.062	1.280	2.4
5	2.788	0.882	3.2
32	2.595	0.696	3.7
33	3.000	0.623	4.8 #
34	2.712	0.219	12.4 #
35	0.693	0.417	1.7
36	4.234	0.257	16.5 #
69	6.125	1.608	3.8 #
70	6.305	0.625	10.1 #
71	7.353	0.361	20.4 #
84	0.636	0.235	2.7
85	0.664	0.188	3.6
99	4.425	0.861	5.1 #
116	1.428	0.850	1.7
120	1.639	0.841	1.9
125	1.867	1.407	1.3
132	2.951	1.420	2.1
$F(0.95)$			3.73

Tab. 4.4 F-Test, Vergleich der Anpassung durch Berechnung der Fehlstrahlungsanteile nach

1. Modell 1 ($p = A$) mit $S_{y \cdot x1}$

2. Modell 3 ($p = A+Bc$) mit $S_{y \cdot x2}$

- Meßstellen bei denen die Nullhypothese abgelehnt wird

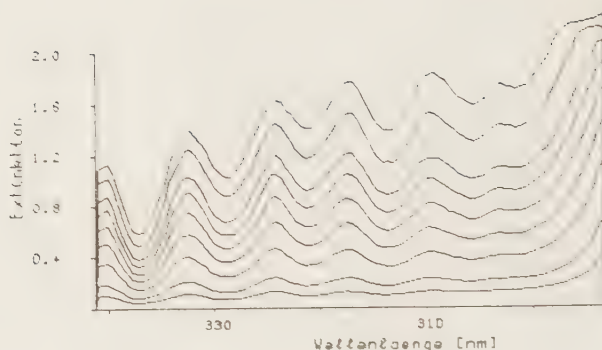


Abb. 4.12 Extinktion der Phenanthren-Eichlösungen (Ausschnitt)

4.4.4 Einfluß der Wellenlängeneinstellung auf die Fehlstrahlung

Der Fehlstrahlungsanteil, der in 4.4.2 berechnet wurde, wird jeweils einer bestimmten Diode und damit einer bestimmten Wellenlänge zugeordnet. Durch Drehung des Gitters im Polychromator wird der erfaßte Spektralbereich verändert und damit auch die Diodennummer - Wellenlängen Beziehung. Der Fehlstrahlungsanteil sollte dabei von der Wellenlänge abhängig sein und nicht von der Diodennummer. In Abb. 4.13 ist der Fehlstrahlungsanteil, der mit den gleichen Phenanthren-Eichlösungen wie in 4.4.2 berechnet wurde, dargestellt; der erfaßte Spektralbereich wurde um 30 nm verschoben (370 - 250 nm). Durch den Vergleich von Fehlstrahlungsanteilen, die mit dem Modell $p = A$ berechnet wurden, bei gleicher Wellenlänge (jedoch unterschiedlicher Diodennummer, $\Delta = 96$ Dioden) kann über den t-Test festgestellt werden, ob die Fehlstrahlungsanteile der gleichen Grundgesamtheit angehören (65).

$$\hat{t} = \frac{|x_1 + x_2|}{\sqrt{\left[\frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2} \right] \left[\frac{\sum \delta_1^2 + \sum \delta_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \right]}} \quad (4.38)$$

Da $\hat{t} < t_{(17, 0.95)} = 2.11$ für den zweiseitigen Test in allen in Tabelle 4.5 dargestellten Beispielen ist, kann die Nullhypothese auf Gleichheit der Parameter A_1 und A_2 auf dem geforderten Niveau nicht abgelehnt werden. Die Größe des beobachteten Fehlstrahlungsanteils wird also von der Wellenlänge bestimmt und ist von der Diodennummer unabhängig.

D_1	D_2	A_1	A_2	$\Sigma \sigma_1^2$	$\Sigma \sigma_2^2$	$\hat{t}$
15	111	0.1220	0.1270	0.058	0.045	1.420
36	132	0.0308	0.0323	0.339	0.192	0.185
70	166	0.0170	0.0178	0.504	0.346	0.076
99	195	0.0110	0.0107	0.354	0.093	0.036
132	228	0.0044	0.0058	0.236	0.181	0.193

Tab. 4.5 Vergleich der Fehlstrahlungsanteile A_1 bei 2 unterschiedlichen Arraypositionen, jedoch gleicher Wellenlänge für D_1 und D_2 durch den t-Test (D_1, D_2 - Diodennummern, $n_1=9, n_2=10$, A_1, A_2 = Fehlstrahlungsanteil (Modell 1))

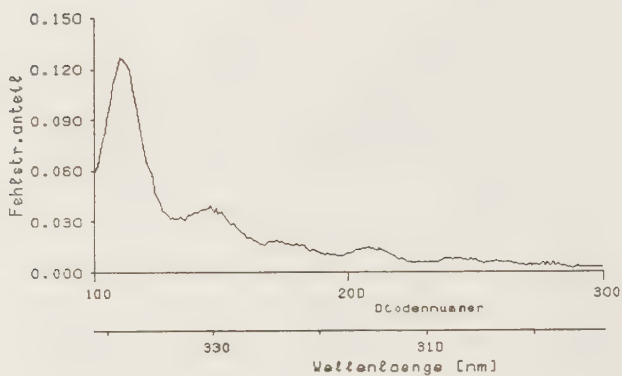


Abb. 4.13 Fehlstrahlungsanteil bei veränderter Arrayposition

5. Kalibrierung und Mehrkomponentenanalyse in einem statischen System

5.1 Bestimmung der Extinktionskoeffizienten

Die Analyse von Peptiden durch UV-Spektroskopie ohne Derivatisierung ist überwiegend auf die drei aromatischen Aminosäuren - Tryptophan (Trp), Tyrosin (Tyr), und Phenylalanin (Phe) - begrenzt. Zur quantitativen Bestimmung der aromatischen Aminosäuren in Peptiden wurde die Mehrkomponentenanalyse angewendet, deren Durchführung im Anhang A1 beschrieben ist. Bevor die Mehrkomponentenanalyse durchgeführt werden kann, wurde mit einer Kalibrierung das spektrale dekadische Absorptionsmaß ϵ (Extinktionskoeffizient) bestimmt. Die Extinktionskoeffizienten der 3 Substanzen wurden nach einem Ausgleichsverfahren über eine Konzentrationsreihe der reinen Komponenten der freien aromatischen Aminosäuren jeweils als Einkomponentensysteme nach

$$\epsilon = \frac{\sum_i \epsilon_i \cdot c_i}{\sum_i c_i^2} \quad (5.1)$$

i - Nr. der Eichlösung

j - Meßstelle

bestimmt. Die auf diese Weise berechneten Extinktionskoeffizienten sind in Abb. 5.1 wiedergegeben. Der Extinktionskoeffizient bestimmt die Empfindlichkeit des spektroskopischen Bestimmungsverfahrens. Bereits das Verhältnis der Extinktionskoeffizienten zeigt, daß auf Grund der unterschiedlichen Empfindlichkeit der 3 Aminosäuren die Genauigkeit, mit der die Analyse durchgeführt wird, variiert. Der Analysefehler $\sigma(c_i)$ bei einem Einkomponentensystem kann nach

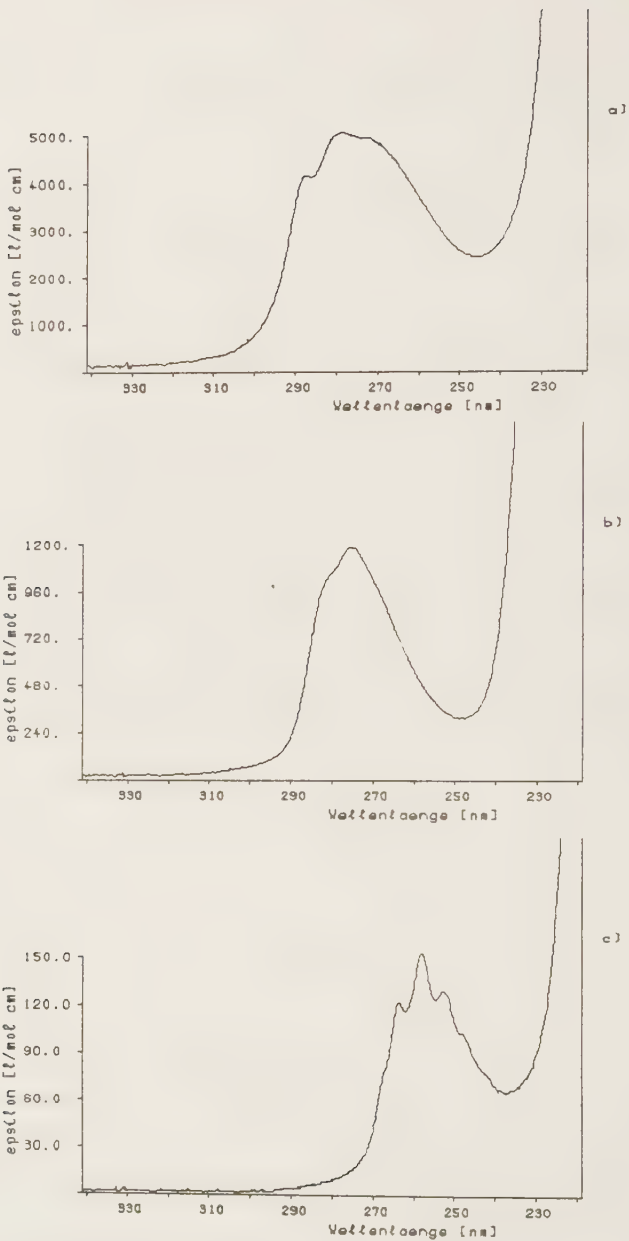


Abb. 5.1 Spektren der aromatischen Aminosäuren
a) Tryptophan
b) Tyrosin
c) Phenylalanin

$$\sigma(c_i) = \frac{1}{d \cdot \varepsilon_{ij}} \sigma(E_{ij}) \quad (5.2)$$

berechnet werden. Ist der Meßfehler $\sigma(E_{ij})$ konstant, führt eine große Empfindlichkeit zu geringen Konzentrationsfehlern $\sigma(c_i)$, während kleine Empfindlichkeiten große Analysenfehler hervorrufen. Bei diesem Beispiel ist das Verhältnis der Extinktionskoeffizienten der Aminosäuren im jeweiligen Maximum

$$\varepsilon(\text{Try}) : \varepsilon(\text{Tyr}) : \varepsilon(\text{Phe}) = 5000 : 1200 : 150,$$

so daß das Verhältnis der Analysenfehler bei gleichem Meßfehler

$$\sigma(c_{\text{Tryp}}) : \sigma(c_{\text{Tyr}}) : \sigma(c_{\text{Phe}}) = 0.03 : 0.125 : 1$$

beträgt.

Bei der Mehrkomponentenanalyse wird der Analysenfehler noch zusätzlich durch die Selektivität bestimmt. Die Selektivität ist ein Maß für die Überlappung von Signalen. Große Signalüberlappungen führen zu großen Analysenfehlern, während einzelnen Komponenten zugeordnete ungestörte Signale gute Genauigkeiten liefern. Der Fehler der Mehrkomponentenanalyse $\sigma_M(c)$ wird aus dem Fehler der Einkomponentenanalyse $\sigma_E(c)$ und der Selektivität Θ definiert.

$$\sigma_M(c_i) = \frac{1}{\Theta_i} \sigma_E(c_i) \quad (5.3)$$

Die Bestimmung der Selektivität bei einem Zweikomponentensystem wird nach Zinn (66) durchgeführt nach

$$\Theta_{12} = \sqrt{1 - \frac{(\sum \varepsilon_{j1} \varepsilon_{j2})^2}{\sum \varepsilon_{j1}^2 \sum \varepsilon_{j2}^2}} \quad (5.4)$$

Allgemein wird für eine Komponente in einem Mehrkomponentensystem die Selektivität, die nur Werte zwischen 0 und 1 annehmen kann, von von Oepen (67) definiert zu

$$\Theta_i = \frac{1}{\sqrt{\varepsilon_{i11}^2} \sqrt{C_{11}}} \quad (5.5)$$

ε_{i11}^2 - i'tes Diagonalelement der

Gaußtransformierten (siehe Anhang)

C_{11} - i'tes Diagonalelement der Kovarianzmatrix

(Inverse der Gaußtransformierten)

Damit werden für das Dreikomponentensystem Trp/Tyr/Phe für unterschiedliche Auswertebereiche die in Tab. 5.1 zusammengefaßten Selektivitäten berechnet. Die Selektivität über den gesamten Meßbereich (Diode 1 bis 512) ist in der ersten Zeile dargestellt. Durch Vergleich mit den Selektivitäten, die ohne die Dioden 1 bis 200 berechnet wurden, wird deutlich, der Wellenlängenbereich von 341 - 292 nm wenig Information enthält; die Selektivität wird nur unwesentlich verändert. Auf den kurzwelligen Spektralbereich (244-219 nm) muß bei der Analyse verzichtet werden, da hier die Absorption anderer Aminosäuren und der Peptidbindung überlagern kann. Anhand der Selektivitäten des Dreikomponentensystems werden zur Analyse die Bereiche 292-282 nm und 262-244 nm ausgewählt.

Diodennr.	Auswerteber.	Θ_1		
		Trp	Tyr	Phe
1-512	341-219 nm	0.2514	0.3048	0.4855
205-512	292-219 nm	0.2436	0.2978	0.4790
205-405	292-244 nm	0.2148	0.2377	0.6797
205-250	292-282 nm	0.2744	0.2902	0.7047
und	und			
330-405	262-244 nm			

Tab. 5.1 Selektivitäten des Dreikomponentensystems
Trp/Tyr/Phe bei verschiedenen Wellenlängen-
bereichen

Der Meßfehler bei der Extinktionsmessung wird durch die Fehlstrahlung (siehe Kap. 4.4) systematisch beeinflusst. Bei Extinktionen größer als 0.4 werden die Einflüsse durch Abweichungen von der Eichgeraden sichtbar (Abb. 5.2). Da der Fehlstrahlungsanteil nicht für alle Substanzen allgemein-gültig exakt bestimmt werden kann, werden Extinktionen bis maximal 0.3 gemessen, so daß der Einfluß der Fehlstrahlung auf den Meßfehler gering bleibt (Abb.5.3).

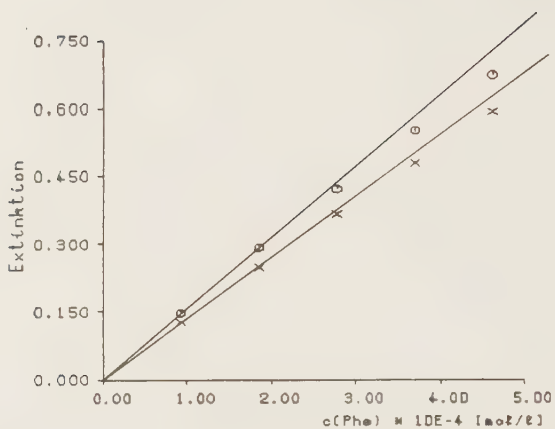


Abb. 5.2 Konzentrationsabhängigkeit der Extinktion von Phenylalanin bei
 x - 248.2 nm
 o - 253.7 nm

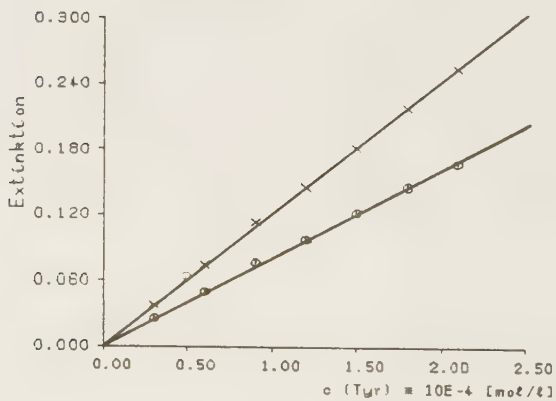


Abb. 5.3 Konzentrationsabhängigkeit der Extinktion von Tyrosin bei
 x - 276.0 nm
 o - 284.7 nm

5.2 Quantitative Mehrkomponentenanalyse der reinen Aminosäuren

Bei der UV-Analyse der Peptide muß zwischen den einzelnen aromatischen Aminosäuren unterschieden werden können. Falls mehrere aromatische Aminosäuren in einem Peptid vorhanden sind, stehen diese in einem ganzzahligen Verhältnis zueinander, das bei der quantitativen Bestimmung ermittelt werden kann. Dazu wurde zunächst an einem statischen System die Nachweisgrenze für die einzelnen Aminosäuren bestimmt. Die Richtigkeit und die Genauigkeit, mit der die Substanzen in einem statischen System bestimmt wurden, können im nächsten Kapitel bei einem dynamischen System berücksichtigt werden.

5.2.1 Nachweisgrenze von aromatischen Aminosäuren

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze der aromatischen Aminosäuren wurde die Mehrkomponentenanalyse auf Spektren des reinen Lösungsmittels angewandt. Auf diese Weise wurde bei der Einkomponentenanalyse ein Blindwert ermittelt, mit dessen Standardabweichung σ , die aus 14 Messungen berechnet wurde, die Nachweisgrenze C_{NWG} festgelegt wurde. Bei n Wiederholungsmessungen wird die Nachweisgrenze um den Faktor $1/\sqrt{n}$ verbessert.

$$C_{NWG} = 3 \cdot \sqrt{2} \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad (5.6)$$

Die Nachweisgrenze des Dreikomponentensystems wird durch die Selektivität beeinflusst. Für die Nachweisgrenze eines Mehrkomponentensystems $C_{NWG,M}$ gilt

$$C_{NWG,M} = \frac{1}{\Theta} C_{NWG,E} \quad (5.7)$$

In Tab. 5.2 sind die Werte zusammengefaßt.

	$\overline{C_B}$ [10 ⁻⁶ M]	σ_B [10 ⁻⁶ M]	$C_{NWG, E}$ [10 ⁻⁶ M]	θ	$C_{NWG, M}$ [10 ⁻⁶ M]
Trp	0.01	0.19	0.81	0.27	3.0
Tyr	0.18	1.01	4.29	0.29	14.8
Phe	2.49	8.13	34.5	0.70	49.3

Tab. 5.2 Nachweisgrenze der aromatischen Aminosäuren
 $\overline{C_B}$ - mittlerer Blindwert, σ - Standardabweichung,
 $C_{NWG, E}$ - Nachweisgrenze im Einkomponentensystem,
 $C_{NWG, M}$ - Nachweisgrenze der drei Aminosäuren im
 Mehrkomponentensystem

Die Nachweisgrenzen der drei Komponenten unterscheiden sich um mehr als eine Zehnerpotenz, da die Empfindlichkeiten des Bestimmungsverfahrens für die drei Aminosäuren in diesem Verhältnis variieren. Das Verhältnis der Nachweisgrenzen der aromatischen Aminosäuren im Einkomponentensystem stimmt im Rahmen der Meßgenauigkeit mit dem in Kap.5.1 gezeigtem Verhältnis der Analysenfehler überein.

$$C_{NWG}(\text{Trp}) : C_{NWG}(\text{Tyr}) : C_{NWG}(\text{Phe}) = 0.016 : 0.124 : 1$$

Durch die Selektivität wird besonders für Tryptophan und Tyrosin, deren Spektren sich stark überlappen, die Nachweisgrenze des Mehrkomponentensystems verschlechtert.

5.2.2 Mehrkomponentenanalyse eines statischen Systems

An einem statischen System wurde die gegenseitige Beeinflussung der Aminosäuren bei der Mehrkomponentenanalyse untersucht. Dazu wurden die Lösungen der reinen Aminosäuren einzeln als 1, 2 und 3 Komponentensysteme behandelt. Im Anhang A1 werden die mathematischen Grundlagen der Mehrkomponentenanalyse beschrieben. Die Konzentrationen der einzelnen Aminosäuren sind so gewählt, daß die Extinktionen der Aminosäuren gleich groß sind (0.04 - 0.25 Extinktionseinheiten). Die Konzentrationsbereiche, die für die Aminosäuren gewählt werden, sind in Tab. 5.3 angegeben. Die Konzentration der beiden anderen Aminosäuren ist jeweils innerhalb der Konzentrationsreihe der 3. Aminosäure Null. Durch den Vergleich der mit dem Programm ANNK26 berechneten Konzentrationen c_{ist} mit den Sollwerten wird die Genauigkeit, mit der die einzelnen Substanzen bestimmt werden können, ermittelt. Die entsprechende Kenngröße ist die Reststreuung R.

$$R = \sqrt{\frac{\sum (C_{soll} - C_{ist})^2}{N - 1}} \quad (5.8)$$

N - Anzahl der Lösungen (=7)

In Tab. 5.3 sind die Ergebnisse der Mehrkomponentenanalyse mit unterschiedlicher Komponentenzahl zusammengestellt. Die Genauigkeit, mit der die Konzentration der jeweiligen Komponente bestimmt werden kann, wird durch die spektrale Überlappung der anderen Komponenten beeinflusst. Die Genauigkeit für die Bestimmung des Phenylalanins wird kaum von den anderen beiden Aminosäuren beeinflusst. Bei dem Zweikomponentensystem Tryptophan und Tyrosin wird eine Verschlechterung der Genauigkeit festgestellt, die auch bei dem Dreikomponentensystem beobachtet wird.

	Restreuung R [10^{-6} M]				Konzentrations- bereiche [10^{-4} M]
	1 Komp.	2 Komponenten		3 Komp.	
Trp (W)	0.34	0.88 (W/Y)	0.26 (W/F)	0.51	0.08- 0.50
Tyr (Y)	0.99	2.85 (W/Y)	1.04 (Y/F)	2.36	0.33- 2.16
Phe (F)	7.57	7.53 (F/W)	7.82 (F/Y)	7.96	2.2 -14.3

Tab. 5.3 Einfluß der Komponentenzahl auf die Reststreuung der Mehrkomponentenanalyse

Die Steigung im Soll - Istwert - Diagramm beträgt 1, wenn mit der Mehrkomponentenanalyse der richtige Wert berechnet wird und keine systematischen Abweichungen vorliegen, die durch Querempfindlichkeiten hervorgerufen werden. In Tab. 5.4 sind diese Steigungen der Soll-Istwert Geraden für die Analysen mit unterschiedlicher Komponentenzahl zusammengestellt. In Abb. 5.4 ist exemplarisch für die Dreikomponentenanalyse des Tryptophans diese Abhängigkeit dargestellt. Die Abweichungen vom Sollwert durch systematische Fehler ist bei dem Zweikomponentensystem Tryptophan und Tyrosin am größten (3.5%). Dieser Effekt, der durch die große spektrale Ähnlichkeit der beiden Aminosäuren hervorgerufen wird, wird auch teilweise bei dem Dreikomponentensystem deutlich.

Für die Konzentration der jeweils anderen Komponente, deren Konzentration Null ist, werden positive und negative Werte gefunden, jedoch unterhalb der Nachweisgrenze.

	Steigung der Soll-Istwert Geraden			
	1 Komp.	2 Komponenten		3 Komp.
Trp (W)	0.993	0.965(W/Y)	1.004(W/F)	0.991
Tyr (Y)	0.998	1.037(Y/W)	1.004(Y/F)	1.030
Phe (F)	0.988	0.991(F/W)	0.991(F/Y)	0.991

Tab. 5.4 Einfluß der Komponentenanzahl auf die Richtigkeit der Mehrkomponentenanalyse

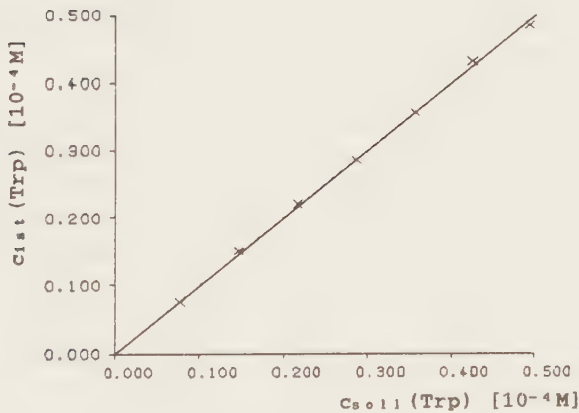


Abb. 5.4 Sollwert - Istwert - Diagramm der Tryptophan-Konzentration, bestimmt aus der Dreikomponentenanalyse

5.3 Einfluß des Lösungsmittels

Die Trennung der Peptide wird mit Hilfe der Gradientenelution im System Acetonitril/Wasser/Trifluoressigsäure durchgeführt. Dabei werden mit steigenden Acetonitrilgehalten die Peptide mit zunehmend hydrophoben Eigenschaften eluiert. Der pH-Wert des Elutionsmittels wird durch gleiche Anteile von Trifluoressigsäure in beiden Lösungsmitteln konstant gehalten. Das Lösungsmittel der Eichlösungen, mit denen die Extinktionskoeffizienten bestimmt wurden, besteht aus 20% Acetonitril, 80% Wasser und 0.1 % Trifluoressigsäure. Durch unterschiedliche Acetonitrilgehalte des Lösungsmittels der Aminosäuren soll festgestellt werden, ob das Acetonitril einen bathochromen oder hypsochromen Effekt auf die Lage des Absorptionsmaximums der Aminosäuren ausübt. Es werden durch eine Eichung die Extinktionskoeffizienten von Tryptophan und Tyrosin bei verschiedenen Acetonitrilgehalten (10,20,30,40 % Acetonitril) bestimmt. Ein Vergleich der Extinktionskoeffizienten bei 10 und 40 % Acetonitril zeigt, daß eine Verschiebung der Absorptionsmaxima nicht stattfindet (Abb. 5.5).

Durch den Gehalt an Acetonitril wird jedoch die Größe der Extinktionskoeffizienten beeinflusst. In Abb. 5.6 wird die Änderung der Extinktionskoeffizienten als Mittelwert über zwei verschiedene Meßbereiche in Abhängigkeit vom Acetonitrilgehalt dargestellt. Der Steigung der Ausgleichsgeraden entsprechend liegt die relative Änderung der Molarextinktionen pro 10 % Acetonitril-Gehalt-Änderung zwischen 10 und 4 % (Tab. 5.5). Dementsprechend wird auch das quantitative Ergebnis der Mehrkomponentenanalyse mit sich ändernder Zusammensetzung des Elutionsmittels beeinflusst. Da jedoch keine spektrale Verschiebung des Spektrums nachgewiesen werden kann, wird das Verhältnis der berechneten Konzentrationen der Aminosäuren zueinander nicht wesentlich beeinflusst.

	Wellenlängen bereich	ϵ (20%CH ₃ CN) [l mol ⁻¹ cm ⁻¹]	$\Delta\epsilon$ [l mol ⁻¹ cm ⁻¹]	ϵ_{rel} = $\Delta\epsilon/\epsilon$
Trp	292-282 nm	4192	171	4.1
	279-270 nm	4970	194	3.9
Tyr	292-282 nm	626	62	9.9
	279-270 nm	1141	61	5.3

Tab. 5.5 Abhängigkeit des Extinktionskoeffizienten ϵ vom Acetonitrilgehalt des Lösungsmittels

ϵ - Mittelwert der Molarextinktion über den Meßbereich bei 20 % Acetonitril,

$\Delta\epsilon$ - Änderung von ϵ bei 10 % Änderung des Acetonitrilgehaltes,

ϵ_{rel} - relative Änderung von ϵ

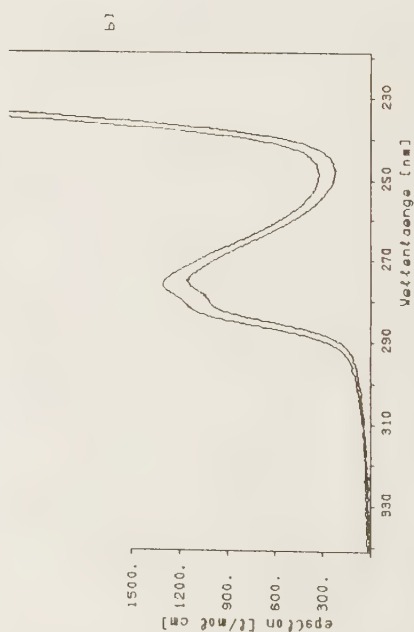
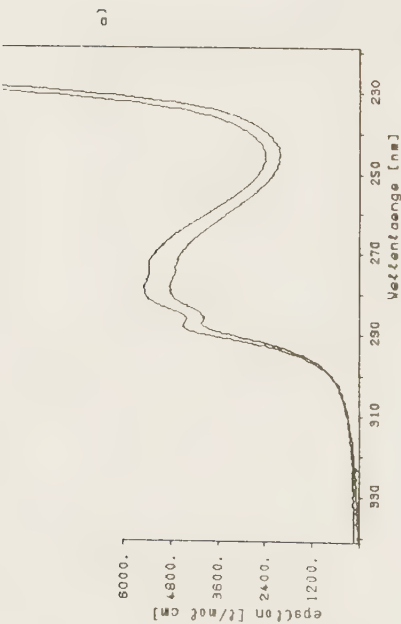


Abb. 5.5 Molarextinktion von
a) Tyrophophan, b) Tyrosin
bei 10 und 40 % Acetonitril-Gehalt
des Lösungsmittels

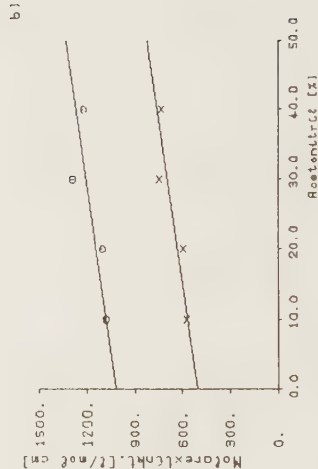
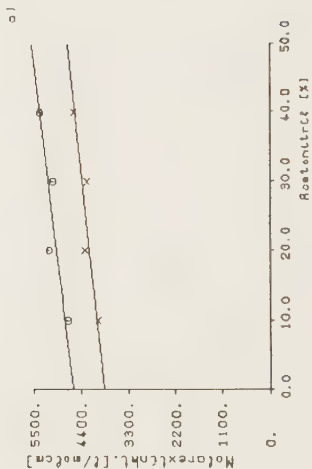


Abb. 5.6 Mittlere Molarextinktion
über die Diolenbereiche
x - 205 - 250 (292-282 nm)
o - 260 - 300 (279-270 nm)
in Abhängigkeit vom Acetonitrilgehalt

6. Quantitative Analyse aromatischer Aminosäuren nach chromatographischer Trennung

Die Trennung von Peptiden mit reversed-phase-HPLC ist weit verbreitet. Zur Identifizierung der eluierten Peptide bzw. zur teilweisen Analyse der Zusammensetzung kann die UV-spektroskopische Beobachtung der aromatischen Aminosäuren beitragen. Dabei ist besonders das Tryptophan von Interesse. Die Bestimmung der Tryptophan-Reste in einem Peptid durch Aminosäureanalyse ist bei vorangehender saurer Hydrolyse der Peptide nicht möglich, da Tryptophan unkontrollierbar zerstört wird. Durch die schnelle Registrierung von Spektren mit einem Diodenarray-Spektrometer als Detektor eines HPLC-Systems kann das Eluat quasi kontinuierlich beobachtet werden. Nach der Übertragung des Chromatogramms auf den Auswerterechner wird durch Mehrkomponentenanalyse der gemessenen Spektren mit Hilfe von Eichspektren eine quantitative Bestimmung der aromatischen Aminosäuren durchgeführt. Zunächst werden 3 Peptide bekannter Zusammensetzung chromatographisch getrennt und die Anwendbarkeit des Auswerteverfahrens getestet. Danach soll an einem komplexeren System, wie es häufig bei biochemischen Fragestellungen auftritt, die Mehrkomponentenanalyse auf Peptide des Lysozyms, die durch eine enzymatische Spaltung gebildet werden, angewendet werden.

6.1 Auswerteverfahren

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgt in 3 Schritten

1. Berechnung der Extinktionen
2. Mehrkomponentenanalyse
3. Berechnung der Sollwertabweichungen

1. Extinktionsberechnung

Da das Diodenarray-Spektrometer ein Einzelstrahlgerät ist, werden die Spektren der Chromatogramme in Intensitätseinheiten gemessen. Als Referenzspektrum (I_0) werden die Spektren des Chromatogramms einer Blindprobe verwendet. Dieses Chromatogramm wird unter den gleichen Meßbedingungen bei gleichem Gradientenverlauf jedoch ohne Probenaufgabe registriert. Somit wird die sich ändernde Zusammensetzung des Elutionsmittels, die das Referenzspektrum beeinflusst, berücksichtigt, wenn das entsprechende Referenzspektrum, das bei gleicher Retentionszeit (gleiche Spektrennummer wie das gemessene Chromatogramm der Peptide) gemessen wurde, zur Extinktionsberechnungen verwendet wird.

Der Nachteil dieses Verfahrens ist jedoch, daß auf Grund des Zeitunterschieds zwischen zwei Chromatogrammen (Dauer eines Chromatogramms ca. 90 Minuten) die wellenlängenabhängige Langzeitänderung der Strahllichte der Lichtquelle nicht berücksichtigt werden kann. Verschiedene Korrekturverfahren können das Auftreten kleiner negativer Extinktionen nicht verhindern.

Die zeitliche Änderung der Extinktion über den erfaßten Spektralbereich des Diodenarrays während der Elution der Peptide kann als dreidimensionale Darstellung der Absorptionsspektren gegen die Zeit aufgetragen werden. In Abb. 6.1 ist ein Ausschnitt des Chromatogramms des Peptidgemisches, daß in Kap. 6.2 quantitative untersucht wird, dreidimensional dargestellt. In jeder Meßstelle (Diode) liefert ein

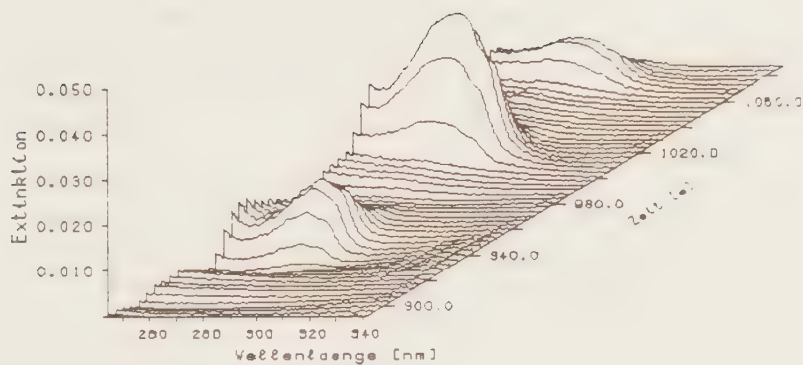


Abb. 6.1 Dreidimensionale Darstellung eines Ausschnitts des Chromatogramms der drei Peptide

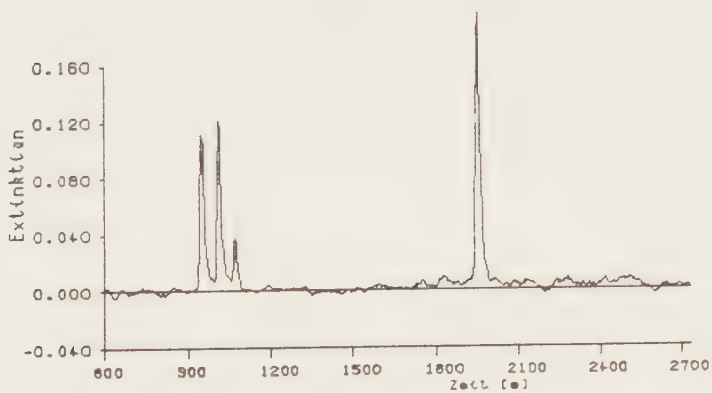


Abb. 6.2 Chromatogramm der 3 Peptide bei $\lambda = 225 \text{ nm}$

Parameterschnitt parallel zur z-Achse (Zeitachse) ein normales zweidimensionales Chromatogramm. In Abb. 6.2 ist die zeitliche Änderung der Extinktionswerte der Diode 486 Wellenlänge 284 nm über alle Spektren aufgezeichnet. Die Peaks der eluierten Peptide heben sich aus dem Rauschen der Grundlinie hervor.

2. Mehrkomponentenanalyse

Die Berechnung der Konzentration wird durch die Mehrkomponentenanalyse deren Vorgehensweise im Anhang beschrieben ist, mit Hilfe des Programms ANNK26 für jedes Spektrum getrennt durchgeführt. Die Abspeicherung der berechneten Konzentrationen erfolgt für jede Komponente einzeln. Eine Darstellung des Konzentrationsprofils der Dreikomponentenanalyse des Peptidgemisches, deren Extinktion in Abb. 6.1 abgebildet sind kann anschließend für jede der drei Komponenten getrennt erfolgen, wie in Abb. 6.3 gezeigt wird. Dabei wird auf Grund der hohen Nachweisgrenze für das Phenylalanin im Vergleich zu den anderen aromatischen Aminosäuren in diesem Konzentrationsbereich eine quantitative Bestimmung des Phenylalanins erschwert.

3. Berechnung der Sollwertabweichungen

Die ausgebrachte Menge m_i der eluierten Substanzen kann aus diesen berechneten Konzentrationen c_i durch Integration über das Volumen V_a bis V_e (während der Elution des Peaks) berechnet werden.

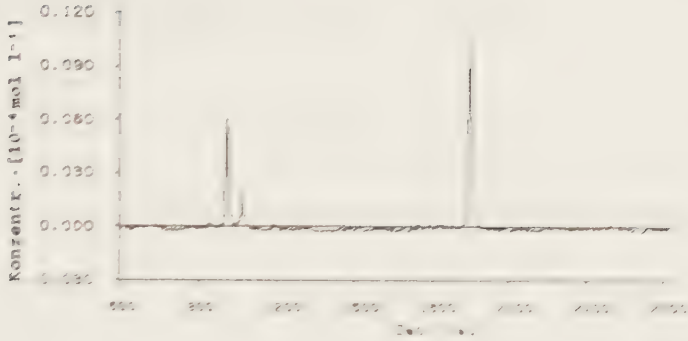
$$m_i = \int_{V_a}^{V_e} c_i \, dV \quad (6.1)$$

m_i - Menge der Komponente i [mol]

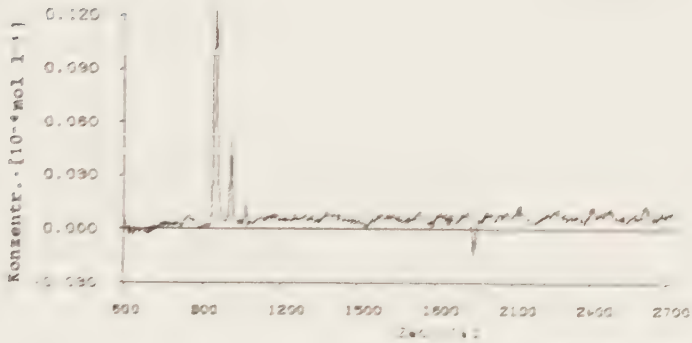
V - Volumen des Eluenten [l]

c_i - aktuelle Konzentration der Komponente i [mol l⁻¹]

Tryptophan



Tyrosin



Phenylalanin

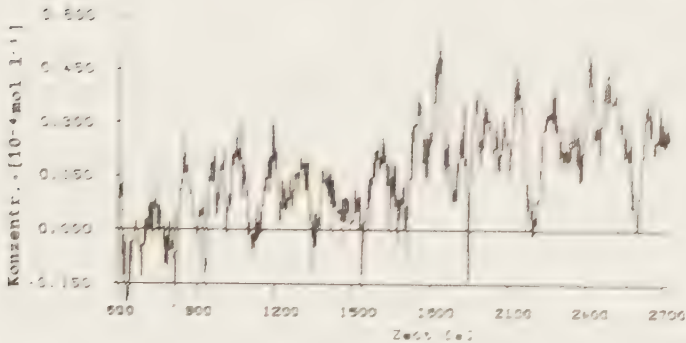


Abb. 6.3 Zeitliche Änderung der berechneten Konzentration der aromatischen Aminosäuren über die Spektren des Chromatogramms (Abb. 6.1)

Integriert man über die Zeit mit den Integrationsgrenzen $t(V_a)$ bis $t(V_e)$ über die gesamte Peakbreite und hält die Durchflußgeschwindigkeit $dV/dt = \dot{V}$ konstant so folgt

$$m_i = \int_{t(V_a)}^{t(V_e)} \frac{dV}{dt} \cdot c_i \cdot dt = \dot{V} \int_{t(V_a)}^{t(V_e)} c_i \cdot dt \quad (6.2)$$

Zur quantitativen Auswertung wird durch Summierung der Konzentration bei bekanntem Zeitintervall zwischen 2 Spektren Δt der Istwert der Stoffmenge der aufgegebenen Substanz m_i berechnet.

$$m_i = \dot{V} \Delta t \sum_{j=1}^N c_{ij} \quad (N=1,2,3\dots w, \quad w = \frac{t(V_e) - t(V_a)}{\Delta t}) \quad (6.3)$$

- $\dot{V}$ - Durchflußgeschwindigkeit [$l \text{ sec}^{-1}$]
 Δt - Zeitintervall zwischen der Aufnahme von
 2 Spektren [sec]
 c_{ij} - Konzentration der Komponente i bei t_j
 zwischen $t_a(V_a)$ und $t_e(V_e)$ [mol l^{-1}]

Durch Vergleich mit den Sollwerten m_s werden die relativen Sollwertabweichungen berechnet.

$$\Delta m [\%] = \frac{m_i - m_s}{m_s} \cdot 100 [\%] \quad (6.4)$$

Die Anzahl der Reste MA der aromatischen Aminosäuren in den Peptiden kann durch

$$MA = \frac{m_i}{m_s} \quad (6.5)$$

abgeschätzt werden. Dabei sollten nur ganzzahlige Werte auftreten.

6.2 Analyse von Peptiden bekannter Zusammensetzung

6.2.1 Zusammensetzung der Peptide

Zur chromatographischen Trennung mit anschließender kontinuierlicher UV-Spektrenregistrierung des Eluats wurden 3 Peptide ausgewählt, deren aromatische Aminosäuren in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander stehen.

Peptid 1:	Try-Pro-Phe-Pro	(4 Aminosäuren)
Peptid 2:	Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly	(8 Aminosäuren)
Peptid 3:	Tyr-Trp-Ala-Trp-Phe	(5 Aminosäuren)

Die Zuordnung der Aminosäuren zu dem 3-Buchstabencode wird in Tab. 6.4 vorgenommen. Die 3 Buchstaben entsprechen in den meisten Fällen den Anfangsbuchstaben der Namen der Aminosäuren. Die aromatischen Aminosäuren in dem jeweiligen Peptid stehen in folgenden Verhältnis zueinander

Peptid 1:	Trp : Tyr : Phe = 0 : 1 : 1
Peptid 2:	Trp : Tyr : Phe = 1 : 1 : 0
Peptid 3:	Trp : Tyr : Phe = 2 : 1 : 1.

Zunächst wurde durch Retentionszeitenvergleich der reinen Peptide die Elutionsreihenfolge der 3 Peptide im Gemisch ermittelt. Die chromatographische Trennung wurde unter den gleichen Bedingungen wie die Trennung der Peptide des Lysozyms durchgeführt.

6.2.2 Versuchsbedingungen

Der Gradient wurde mit Hilfe der beiden Lösungsmittel

A: Wasser, 0.1% Trifluoressigsäure

B: Acetonitril, 0.1% Trifluoressigsäure

gebildet. Der Acetonitrilgehalt des Elutionsmittels wurde durch die Gradientenprogrammierung in 4 Stufen von 18 Minuten von 10% auf 100% Acetonitril gesteigert (Tab. 6.1). Um die Säule für das nächste Chromatogramm vorzubereiten, wurde mit einem steileren Gradienten auf die Anfangszusammensetzung zurückgefahren.

Stufe	Zeit [min]	Gradient von B [% min ⁻¹]	Anteil der Lösung B [%]
1	0 - 18	1	10 - 28
2	18 - 36	1	28 - 46
3	36 - 54	1	46 - 64
4	54 - 72	2	64 - 100
5	72 - 90	-5	100 - 10

Tab. 6.1 Gradientenprogramm zur Elution der Peptide

Die Durchflußgeschwindigkeit wurde mit 1 ml min⁻¹ vorgewählt und während eines Chromatogramms am Detektorausgang kontrolliert. Das Volumen V_s der aufgegebenen Probenlösung betrug 15 µl. Mit der Konzentration der Probenlösung wird der Sollwert der Stoffmenge m_s berechnet.

$$m_s = c \cdot V_s \quad (6.6)$$

Die Bedingungen für die Spektrenregistrierung mit dem Diodenarray und die Datenübertragung zum Auswerterechner bestimmen den Zeitbedarf für ein Spektrum. Bei einer Integrationszeit von 53.6 ms, der Akkumulationsrate von 32 Scans, einem Zeitintervall entsprechend 2 Scans zwischen zwei Spektren und dem Zeitbedarf zur Übertragung von 512 Werte (9600 Baud) beträgt der Zeitabstand zwischen zwei Spektren 3.56 Sekunden. Der Speicherplatzbedarf für ein Chromatogramm mit 600 Spektren beträgt 614.4 kByte.

6.2.3 Berechnung der Konzentrationen und der Sollwertabweichungen

Am Beispiel des Peptids 1 soll noch einmal die Problematik der Mehrkomponentenanalyse der drei aromatischen Aminosäuren gezeigt werden, deren quantitative Ergebnisse in Abb. 6.4 dargestellt sind. Das Tryptophan, das in dem Peptid nicht vorhanden ist, wird auch nicht detektiert. Das Konzentrationsprofil der Tyrosinkonzentration entspricht der Peakform. Die berechnete Konzentration des Phenylalanins ist in allen Fällen kleiner als die Nachweisgrenze ($C_{NWGM} = 0.49 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$). Die Peakform ist zwar auch hier annähernd wiedergegeben, doch an der Stelle, wo keine Substanz eluiert wird, werden auf Grund des fehlerhaften Referenzspektrums (I_0) Konzentrationen, die gleich groß oder größer sind als im Bereich des eluierten Peptids (jedoch im allgemeinen unterhalb der Nachweisgrenze), gefunden. Die quantitative Bestimmung des Phenylalanins wird deshalb zum größten Teil nicht durchgeführt, da der Fehler auf Grund der geringen Empfindlichkeit des Bestimmungsverfahrens für das Phenylalanins zu groß ist.

Die relative Sollwertabweichungen des Zweikomponentensystems Tryptophan/Tyrosin sind für die drei Peptide in Tab. 6.2 aufgeführt. Zur Berechnung der Sollwerte m_s wurden die Angaben der Einwaagemengen der Hersteller eingesetzt, da

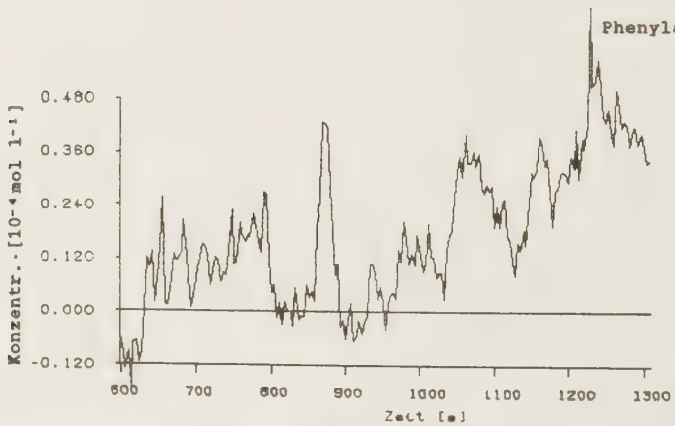
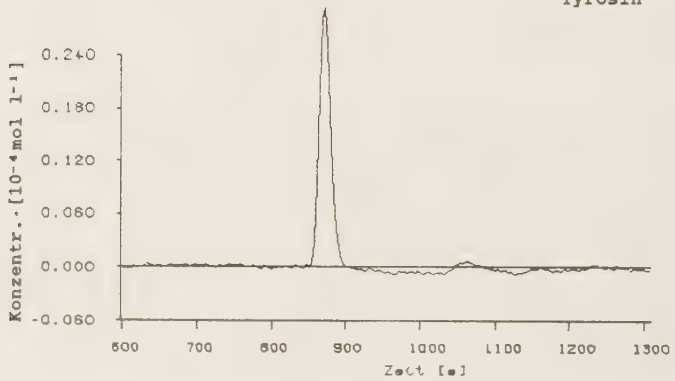
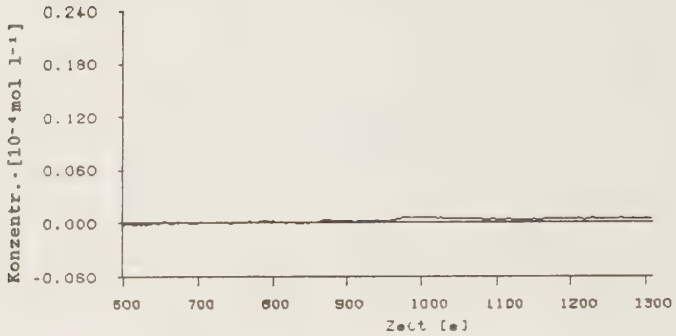


Abb. 6.4 Zeitliche Änderung der berechneten Konzentration der aromatischen Aminosäuren des Chromatogramms von Peptid 1

nur mg-Mengen zur Verfügung standen. Die relativen Sollwertabweichungen für Tryptophan liegen im allgemeinen zwischen 3 und 10% . Größere Abweichungen wurden bei geringeren Konzentrationen der eingesetzten Lösung beobachtet. Das Peptid, in dem nur Tyrosin und kein Tryptophan vorliegt, zeigte eine positive Sollwertabweichung um 37%, die oberhalb der Rauschgrenze liegt. Die Abweichungen des Tyrosins waren bei Anwesenheit von Tryptophan besonders groß. Es wurden bis zu 50% Tyrosin zuwenig gefunden. Ist das Verhältnis der beiden Aminosäuren $\text{Trp:Tyr} = 2:1$, wird die Nachweisgrenze für Tyrosin unterschritten.

Systematische Fehler, die bei der Bestimmung des Tyrosins besonders deutlich werden, können z.B. durch ungenaue Angaben der Einwaagemengen oder fehlerhafte Eichspektren hervorgerufen werden, da, wie bereits in Kap. 2.3 erwähnt, die freien Aminosäuren gegenüber demselben Aminosäurerest in einem Peptid Verschiebungen der Absorptionsspektren aufweisen können. Dieser Einfluß der Nachbargruppen kann jedoch von Peptid zu Peptid unterschiedlich sein, so daß eine allgemeingültige Aussage im Vergleich der freien Aminosäure zu den blockierten Aminosäuren nicht gemacht werden kann.

Die durch die Analyse erfaßten Aminosäurereste können durch das Verhältnis der Istwerte zu den Sollwerten berechnet werden, wie in Tab. 6.3 zusammengefaßt ist. Für das Tyrosin kann auf Grund der hohen Sollwertabweichungen nur eine Tendenz zu einer bestimmten Anzahl von Resten durch Rundung auf ganzzahlige Integerwerte festgestellt werden. Die quantitative Analyse des Tryptophans, das an dieser Stelle besonders berücksichtigt werden soll, ist mit geringeren Fehlern behaftet, so daß hier eine eindeutige Aussage über die Anzahl der Tryptophanreste gemacht werden kann. Obwohl also die Mehrkomponentenanalyse der drei aromatischen Aminosäuren für das Tyrosin und für das Phenylalanin mit Schwierigkeiten behaftet ist, wird dennoch der Versuch gemacht, die quantitative Analyse auf ein komplexeres System - Peptide des Lysozyms - anzuwenden.

Nr. des Chromatogr.	Tryptophan			Tyrosin		
	m_s [nmol]	m_i [nmol]	Δm [%]	m_s [nmol]	m_i [nmol]	Δm [%]
Peptid 1						
1	-	-	-	8.96	12.28	37
2	-	-	-	8.96	12.04	34
3	-	-	-	2.99	4.90	64
4	-	-	-	5.97	8.24	39
5	-	-	-	3.58	4.96	39
Peptid 2						
6	6.02	5.96	-5.5	6.02	3.04	-50
7	6.02	5.49	-8.8	6.02	3.08	-49
3	2.01	1.71	-15	2.01	1.19	-41
4	1.00	0.78	-22	1.00	0.55	-45
5	2.41	2.28	-5.4	2.41	2.11	-12.4
Peptid 3						
8	18.06	16.6	-8.1	9.03	-	-100
9	18.06	16.5	-8.6	9.03	-	-100
3	6.02	5.4	-10.3	3.01	-	-100
4	3.01	3.1	3.0	1.50	-	-100
5	3.61	3.7	2.5	1.81	-	-100

Tab. 6.2 Ergebnisse der Zweikomponentenanalyse von Tryptophan und Tyrosin in verschiedener Chromatogramme der 3 Peptide

m_s - Sollwerte (berücksichtigt die Anzahl der Aminosäurereste n im Peptid)

$$m_s = m_s(\text{Einwaage}) \cdot n \text{ [nmol]}$$

m_i - berechnet Stoffmengen (Istwerte) [nmol]

Δm - relative Sollwertabweichungen [%] (Gl.6.4)

Nr. des Chromatogr.	$\frac{m_1(\text{Trp})}{m_s}$	$\frac{m_1(\text{Tyr})}{m_s}$	$\frac{m_1(\text{Trp})}{m_1(\text{Tyr})}$
Peptid 1			
1	-	1.37	-
2	-	1.34	-
3	-	1.64	-
4	-	1.38	-
5	-	1.39	-
Mittelwert:	-	1.42 ± 0.12	-
Sollwert:	0	1	0
Peptid 2			
6	0.95	0.50	1.87
7	0.91	0.51	1.78
3	0.85	0.59	1.43
4	0.78	0.55	1.42
5	0.95	0.86	1.06
Mittelwert:	0.89 ± 0.07	0.60 ± 0.15	1.51 ± 0.32
Sollwert:	1	1	1
Peptid 3			
8	1.89	-	-
9	1.83	-	-
3	1.79	-	-
4	2.07	-	-
5	2.04	-	-
Mittelwert:	1.91 ± 0.13	-	-
Sollwert:	2	1	2

Tab. 6.3 Verhältnis der Soll- m_s und Istwerte m_1 für Tryptophan und Tyrosin = Anzahl der Aminosäurereste pro Peptid
Verhältnis der Istwerte m_1 der Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin zueinander = Verhältnis der Aminosäuren im Peptid

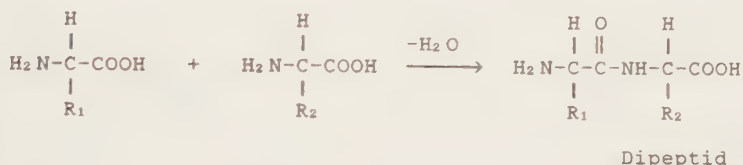
6.3 Analyse des tryptisch-verdauten, S-Carboxymethylierten Lysozym

Um die Aminosäuresequenz einer langen Polypeptidkette aufzuklären, ist es erforderlich, die Kette in kleinere Fragmente zu spalten und die einzelnen Peptide in ihrer Zusammensetzung und Sequenz zu analysieren. Damit ist ein entscheidender Schritt zur Aufklärung der Struktur des Proteins getan. Durch den Einsatz von Enzymen kann eine Polypeptidkette an definierter Stelle gespalten werden. Dabei gilt das Interesse besonders den hochspezifischen Proteasen, zu denen z.B. das Trypsin gehört, die die Polypeptidkette partiell oder selektiv hydrolysieren. Bei der Verdauung von nativen Proteinen wird die partielle Hydrolyse nur unvollständig durchgeführt, da vorhandene Tertiärstrukturen einen Angriff der Proteasen behindern können. Deshalb ist es vor der enzymatischen Spaltung der Polypeptidkette notwendig, die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine zu zerstören. Dieses geschieht durch Denaturierung und Spaltung von Disulfidbrücken, wie später beschrieben wird.

Es soll untersucht werden, ob eine teilweise Aufklärung der Zusammensetzung der Proteine durch die spektroskopische Bestimmung der aromatischen Aminosäuren in den Fragmenten durchgeführt werden kann. Als Protein wird Lysozym, das aus dem Hühnereiweiß gewonnen wird, ausgewählt, da seine Struktur vollständig aufgeklärt ist, und Lysozym außerdem eine relativ große Anzahl von aromatischen Aminosäuren in der Polypeptidkette aufweist. Nach der chemischen Modifizierung des Lysozyms und der enzymatischen Spaltung der Polypeptidkette werden die Peptide mit HPLC getrennt und die aromatischen Aminosäuren quantitativ bestimmt.

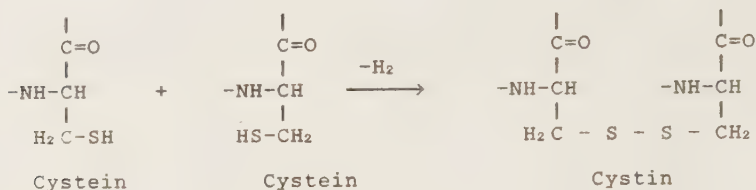
6.3.1 Struktur des Lysozym

Die Aminosäuren, die eine Aminogruppe in α -Stellung zu einer Carboxylgruppe tragen, unterscheiden sich durch die Seitenkette R. Alle Aminosäuren (bis auf Glycin, $R=H$) sind optisch aktiv. Nur die L-Aminosäuren sind Bausteine von Proteinen der Säugetiere. Durch Kondensation der Aminogruppe mit der Carboxylgruppe wird die Peptidbindung ausgebildet.



Proteine sind hochmolekulare Verbindungen, die sich aus 20 bis 25 verschiedenen α -Aminosäuren zusammensetzen. Die einzelnen Polypeptidketten der meisten Proteine mit bekannter Struktur enthalten 100 bis 300 Aminosäuren (Molekulargewicht 12000 bis 36000 Dalton) (70). Die Sequenz der Aminosäuren in einem Protein wird als Primärstruktur bezeichnet. Durch das fast unbegrenzte Potential an Kombinationsmöglichkeiten der Aminosäuren in Peptidketten werden zur Zeit durch lebende Zellen auf der Erde 10^{11} verschiedene Proteine produziert (69), von denen bisher nur eine vergleichsweise geringe Zahl in ihrer Sequenz aufgeklärt sind. Durch Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der Peptidkette werden Sekundärstrukturen wie α -Helix und β -Faltblattstrukturen ausgebildet. Durch die Tertiärstruktur wird die dreidimensionale Struktur der Polypeptidkette über größere Bereiche festgelegt. Die meisten größeren Proteine besitzen zwei oder mehr Ketten, zwischen denen normalerweise keine kovalenten Bindungen bestehen. Als Quartärstruktur bezeichnet man die Anordnung der einzelnen Polypeptidketten zueinander.

Lysozym besteht aus einer einzigen Polypeptidkette mit 129 Aminosäuren. Durch Disulfidbrücken der Cystein-Reste werden zusätzlich Quervernetzungen innerhalb des Moleküls durch kovalente Bindungen ausgebildet.



Daher ist eine einfache Spaltung des Proteins durch ein Enzym nicht möglich. Die Spaltung der Disulfidbrücken muß zuvor durch Reduktion des Cystins zum Cystein und anschließende Alkylierung zum S-Carboxymethyl-cystein durchgeführt werden (siehe Kap. 6.3.2). Eine schematische Darstellung des Lysozym ist in Abb. 6.5 wiedergegeben. Die 8 Cystein-Reste des Proteins bilden 4 Cystine über die Disulfidbrücken aus. In Tab. 6.4 ist die Aminosäurezusammensetzung des Lysozyms wiedergegeben. Die aromatischen Aminosäuren sind mit 6 Tryptophan-, 3 Tyrosin- und 3 Phenylalanin-Resten vertreten.

Das verwendete Enzym Trypsin spaltet die Polypeptidkette selektiv auf der Carboxylseite von Arginin- und Lysin-Resten. Auf Grund der Sequenz und Anzahl dieser Aminosäuren werden 14 Peptide und 4 freie Aminosäuren bei einer vollständigen Umsetzung gebildet. Unvollständige enzymatische Spaltungen werden jedoch beobachtet, wenn Prolin als nächste Aminosäure in der Polypeptidkette auftritt, oder acide oder positiv geladene Gruppen in Nachbarschaft zu den zu spaltenden Peptidbindungen auftreten. Auch wenn Lysin oder Arginin N-terminal angeordnet sind (am Anfang einer Polypeptidkette), werden häufig nur partielle Spaltungen beobachtet. Trypsin ist häufig auch durch das Enzym Chymotrypsin verun-

reinigt. Chymotrypsin gehört zu den weniger spezifischen Enzymen und spaltet bevorzugt auf der Carboxylseite aromatischer oder großer hydrophober Seitenketten, wie sie bei den Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan und Leucin zu finden sind. Durch die unvollständige Spaltung durch das Trypsin und durch chymotryptische Aktivität kann die Zahl der Peptide über die zuvor beschriebene Zahl hinausgehen.

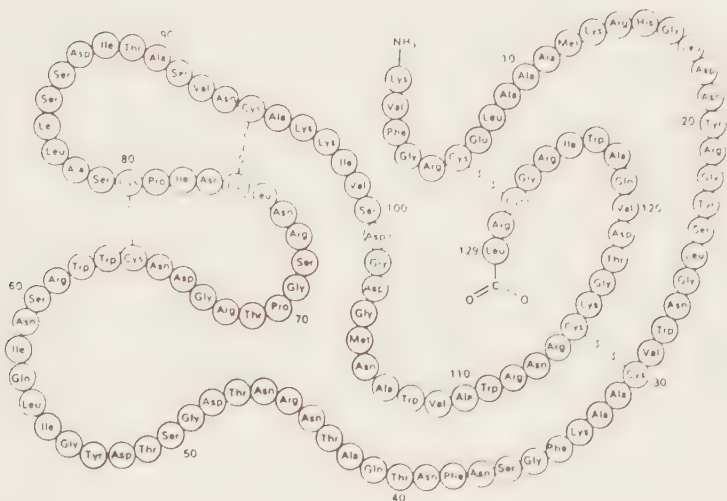


Abb. 6.5 Aminosäuresequenz von Lysozym aus Hühnereiweiß nach (71)

6.3.2 S-Carboxymethylierung und tryptische Verdauung des Lysozym

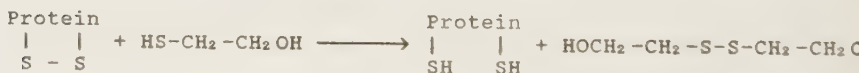
Die Umsetzung des Lysozym und die enzymatische Spaltung wird im folgenden einzeln aufgeführt.¹

1. Denaturierung

Durch die Denaturierung verlieren die Polypeptidketten der Proteine ihre charakteristische native Struktur. Bei extremen pH-Werten, hohen Temperaturen oder z.B. in Harnstoff- oder Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung wird die Sekundär- bzw. Tertiärstruktur der globulären Proteine zerstört. Da die kovalenten Bindungen im Grundgerüst der Polypeptidkette nicht gelöst werden, bleibt die Primärstruktur intakt. Erst nach der Denaturierung ist die Voraussetzung für eine vollständige Reduktion und Alkylierung der Cystine in dem entfalteten Molekül gegeben.

2. Reduktion der Cystin-Reste

Bei Anwesenheit von Tryptophan in einem Protein wird von Crestfield (72) vorgeschlagen, eine Spaltung der Disulfidbrücken durch Reduktion der Cystin-Reste mit 2-Mercaptoethanol im Überschuß unter Ausschluß von Sauerstoff durchzuführen.

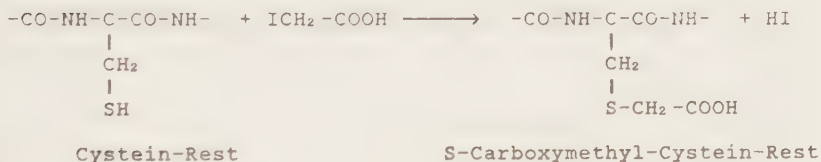


¹Herrn Dr. H.H. Kiltz, Lehrstuhl für Biochemie der RUB danke ich für die Beratung bei biochemischen Fragestellungen, sowie die Durchführung der Gelpermeationschromatographie und der Aminosäureanalyse

Durch eine Zugabe von Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) werden Schwermetallionen komplexiert, die sonst bereits in Spuren die Oxidation der Sulfhydryl-Gruppe katalysieren.

3. Alkylierung der Sulfhydryl-Gruppen

Um eine erneute Bildung von Disulfidbrücken zu verhindern, werden die Sulfhydryl-Gruppen der Cysteine mit Iodessigsäure unter Lichtausschluß (um die Bildung von Iod zu verhindern) zum S-Carboxymethyl-cystein alkyliert.



Es muß mit einem Überschuß an Iodessigsäure gearbeitet werden, da alle Sulfhydryl-Gruppen alkyliert werden, also auch nicht abreagiertes Mercaptoethanol. Da die Iodessigsäure auch mit anderen Aminosäure-Resten (z.B. Histidin und Methionin) reagieren kann, müssen die Reaktionsbedingungen wie pH-Wert und Temperatur exakt eingehalten werden.

4. Experimentelle Durchführung

Die von Noda et. al. (74) beschriebene Reduktion und Carboxymethylierung von Proteinen wurde mit geringfügigen Änderungen übernommen. Zu 50 mg (= 3.5 µmol) Lysozym unter N₂-Atmosphäre wurden in Anwesenheit von 3% SDS-, 0.5M Tris-(hydroxymethyl)-methylamin - pH 8.3 - und 2mM EDTA-Lösung 1.43 mmol 2-Mercaptoethanol (50facher Überschuß) zugegeben. Die Reaktion wurde 5min bei 96°C durchgeführt. Nach der Reduktion wurde die Alkylierung mit 0.316g (1.7 mmol) Iodessigsäure - in 1.19 ml 1N NaOH gelöst - durchgeführt. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 2-Mercaptoethanol abgestoppt, da Mercaptoethanol die

nicht abreagierte Iodessigsäure bindet.

5. Isolierung des SCM-Lysozym

Die Abtrennung der niedermolekularen Verbindungen von dem S-Carboxymethylierten (SCM) Lysozym wurde mit Gelpermeationschromatographie² durchgeführt. Durch Dialyse der gesammelten Fraktionen wurde auf dem Protein adsorbiertes Natriumdodecylsulfat ausgewaschen und anschließend das SCM-Lysozym mit Hilfe der Gefriertrocknung isoliert. Die Ausbeute von 63 mg SCM-Lysozym war etwa 25 % größer als die Einwaage. Durch die quantitative Bestimmung mit Hilfe der Aminosäureanalyse wurde festgestellt, daß das isolierte SCM-Lysozym nur zu 50% aus Aminosäuren besteht. Die Ursache hierfür konnte nicht geklärt werden. Es ist jedoch anzunehmen, daß der Unterschied durch eingeschlossenes Wasser hervorgerufen wird. Mit der Aminosäuresummenanalyse wurde weiter festgestellt, daß 80% der Cysteine zu Carboxymethyl-Cystein alkyliert wurden (Tab. 6.4). Die Bromcyan-Spaltung ergab, daß Methionin nicht mit der Iodessigsäure reagiert hatte, da Methionin überwiegend als Homoserin wiedergefunden wurde.

6. Enzymatische Spaltung

Ein Teil des SCM-Lysozym wurde mit Trypsin im Verhältnis 25:1 6 Stunden bei 37°C umgesetzt. Anschließend wurden nach einer Gefriertrocknung die Peptide und das Trypsin in 1.5 ml 66.7% Ameisensäure aufgenommen. Die Lösung der Peptide ($c = 0.43 \mu\text{mol l}^{-1}$) wurde der chromatographischen Trennung zugeführt.

² Säule Supperose 6, Pharmacia

Aminosäure	Abkürzungen		Anzahl der Aminosäure-Reste	
			theoretisch	berechnet
Alanin	Ala	A	12	12.1
Arginin	Arg	R	11	10.7
Asparagin	Asn	N	13	20.9 (N+D)
Asparaginsäure	Asp	D	8	
Cystein	Cys	C	8	6 (als CM-Cys)
Glutamin	Gln	Q	3	5.2 (Q+E)
Glutaminsäure	Glu	E	2	
Glycin	Gly	G	12	12.0
Histidin	His	H	1	1.0
Isoleucin	Ile	I	6	5.5
Leucin	Leu	L	8	7.9
Lysin	Lys	K	6	5.7
Methionin	Met	M	2	0.2
				+1.9 (Homoserin)
Phenylalanin	Phe	F	3	3.0
Prolin	Pro	P	2	-
Serin	Ser	S	10	8.7
Threonin	Thr	T	7	6.8
Tryptophan	Trp	W	6	2.5
Tyrosin	Tyr	Y	3	2.9
Valin	Val	V	6	5.7

Tab. 6.4 Vergleich der erwarteten und mit Aminosäureanalyse bestimmten Aminosäurereste im Lysozym nach Carboxymethylierung und Bromcyan-Spaltung

6.3.3 Quantitative Analyse

Eine Liste der Peptide, die durch Spaltung der Disulfidbrücken und tryptische Verdauung des SCM-Lysozym gebildet werden ist im Anhang zusammengestellt. In Tab. 6.5 sind die Peptide, die aromatische Aminosäuren enthalten aufgeführt.

Peptid Nr.	Nr. der Aminosäure entspr. der Sequenz im Lysozym	Anzahl der aromatischen Aminosäurereste		
		Phe	Tyr	Trp
2	2 - 5	1		
5	15 - 21		1	
6	22 - 33		1	1
7	34 - 45	2		
8	46 - 61		1	
9	62 - 68			2
13	98 - 112			2
16	117 - 125			1

Tab. 6.5 Peptide des Lysozym mit aromatischen Aminosäuren nach enzymatischer Spaltung mit Trypsin

Peptide, die nur Phenylalanin als aromatische Aminosäure enthalten, können auf Grund der geringen Empfindlichkeit des Bestimmungsverfahrens für das Phenylalanins unter diesen Bedingungen nicht detektiert werden. Da die Peptide, die kein chromophores System haben, auf Grund fehlender UV-Absorption nicht detektiert werden, werden theoretisch 6 Peptide, die die Tryptophan und/oder Tyrosin enthalten, angezeigt. Ein Schnitt in Abb. 6.6 durch das dreidimensio-

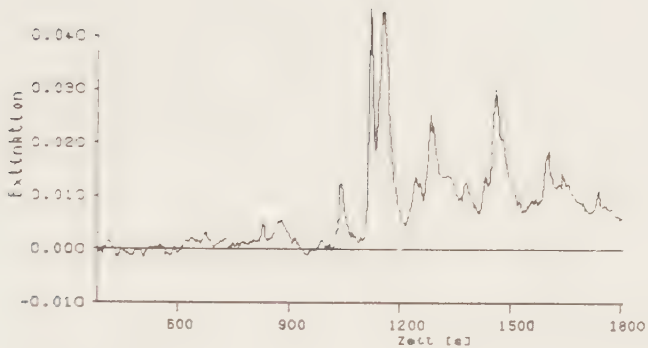


Abb. 6.6 Chromatogramm der Peptide des SCM-Lysozym
bei $\lambda = 279 \text{ nm}$

nale Chromatogramm der Peptide des Lysozym zeigt jedoch eine größere Anzahl von Peptiden mit aromatischen Aminosäuren.

Die Reihenfolge der Elution der Peptide wurde von verschiedenen Autoren unter unterschiedlichen Bedingungen mit Aminosäureanalyse überprüft (54-57). Obwohl die Reihenfolge mit den Bedingungen variieren kann, gilt allgemein, daß Tryptophanhaltige Peptide zum Schluß eluiert werden, da Tryptophan die stärkste hydrophobe Aminosäure ist, wie von Molnar und Schoeneshoefer (50) auch anhand der Retentionskoeffizienten bei verschiedenen pH-Werten festgestellt worden ist. Nach Sasagawa (54), der die Trennung auch mit einem Gemisch von Acetonitril, Wasser und Trifluoressigsäure durchführte, wird die vermutliche Reihenfolge der Tryptophan- und Tyrosinhaltigen Peptide in Tab. 6.6 zusammengestellt.

Reihenfolge der Elution	Peptid Nr.	Nr. der Amino- säure	Anzahl der arom. Aminosäuren	
			Trp	Tyr
1	5	15 - 21		1
2	9	62 - 68	2	
3	8	46 - 61		1
4	16	117 - 125	1	
5	6	22 - 33	1	1
6	13	98 - 112	2	

Tab. 6.6 Reihenfolge der Elution nach (54) mit
Aminosäureanalyse überprüft

Durch unvollständige tryptische Verdauung bzw. chymotryptische Aktivität werden zusätzliche Peptide mit längeren bzw. kürzeren Polypeptidketten gebildet, die die Anzahl der eluierten Peaks erhöhen. An zwei Beispielen wird die Bildung dieser Nebenprodukte, wie sie in der Literatur erwähnt werden, erläutert.

1. Beispiel: Neben Peptid 13 (98-112) wird durch unvollständige enzymatische Spaltung auch ein Peptid (97-112) gebildet, das auf Grund der verkürzten Retentionszeit im Vergleich zu Peptid 13 später als Peptid 16 eluiert wird.

2. Beispiel: Durch chymotryptische Aktivität wird das Peptid 13 zum Tryptophan hin gespalten; das neue Peptid (109-112) eluiert gleichzeitig mit Peptid 9.

Durch die Detektion des Eluates der Peptide des Lysozym mit dem Diodenarray-Spektrometer und durch die Anwendung des Programms ANNK26 zur Mehrkomponentenanalyse auf das Peptidgemisch des tryptisch verdaulichem SCM-Lysozym wird die Konzentration für das Zweikomponentensystem berechnet. Der zeitliche Verlauf der Konzentration ist in Abb. 6.7 für die beiden Komponenten Tryptophan und Tyrosin getrennt dargestellt. Aus Abb. 6.7a) wird deutlich, daß die theoretische Anzahl der Peptide, die Tryptophan enthalten, von 4 bei weitem überschritten wurde. Falls bei der enzymatischen Spaltung die einzelnen Peptide im gleichen Verhältnis gebildet werden, sollte das Ergebnis der quantitativen Bestimmung der aromatischen Aminosäurereste der eingesetzten Menge oder einem Vielfachen entsprechen, da die Anzahl der Tryptophanreste pro Peptid (Peak) unterschiedlich sein kann. Tab. 6.7 zeigt die Auswertung von drei Chromatogrammen exemplarisch an drei verschiedenen Peaks zur Retentionszeit t_R . Anhand der in diesem Rahmen zu erzielenden Reproduzierbarkeit der Bestimmung ist zu erkennen, daß die Peptide in unterschiedlichen Mengen gebildet werden und der Sollwert nur in einem Fall annähernd erreicht wird.

Da die enzymatische Spaltung des Lysozym nicht eindeutig ist und eine große Anzahl von Nebenprodukte gebildet wird, kann eine quantitative Bestimmung der Tryptophanreste im Peptid nicht durchgeführt werden, da die Stoffmengen der einzelnen Peptide nicht bekannt sind. Integriert man jedoch die Konzentration über den gesamten Bereich (580 - 1570 sec) (Tab. 6.8) erhält man die Gesamtzahl der Tryptophanreste des Lysozym.

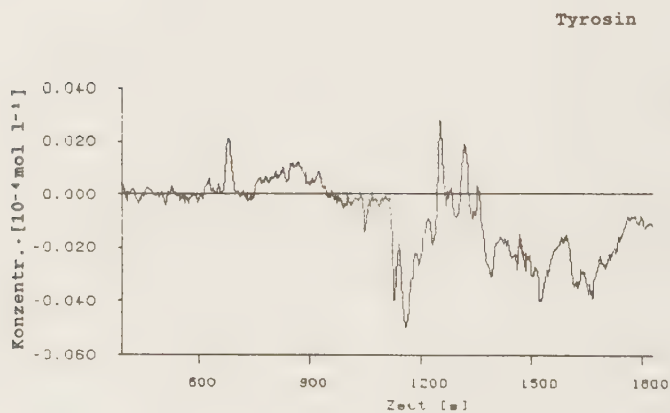
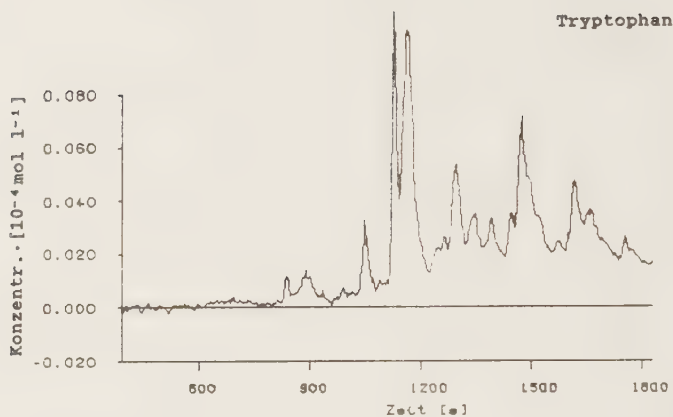


Abb. 6.7 Zeitliche Änderung der Konzentration berechnet mit der Mehrkomponentenanalyse aus den Spektren der Trennung der Peptide des Lysozym

t _R [sec]	m ₁ [nmol]			
	C 1	C 2	C 3	Mittelwert
1040	0.90	1.06	1.16	1.04
1118	2.81	2.91	2.90	2.87
1153	5.76	6.37	6.88	6.34

Tab. 6.7 berechnete Stoffmengen m₁ von drei Tryptophanhaltigen Peptiden des Lysozym bei Reproduzierung der Trennung in drei Chromatogrammen (C1,C2,C3)
(m_s (Lysozym)=6.6 nmol)

	Chromatogramm			Mittelwert
	1	2	3	
m ₁ [nmol]	35.24	41.33	42.26	39.61
n	5.34	6.26	6.4	6.0
Δn [%]	-11.0	4.3	6.7	0

Tab. 6.8 Mehrkomponentenanalyse der Tryptophanhaltigen Peptide
m₁ - berechnet Stoffmengen aller Tryptophanhaltigen Peptide m₁ ,
n - berechnete Anzahl der Tryptophanrest insgesamt
n=m₁ /m_s (m_s=6.6 nmol) ,
Δn - relative Abweichung der Stoffmenge unter Berücksichtigung der Anzahl der Tryptophanreste

Bei der Berechnung der Konzentrationen des Tyrosins werden auch negative Konzentrationen (Abb. 6.7b) berechnet, wie bereits im Kap. 6.2 bei hohen Tryptophan Konzentrationen beobachtet wurde. Negative Konzentrationen können auf zwei Fehlerquellen zurückgeführt werden: auf die Streuung der gemessenen Extinktionsspektren oder auf Fehler in der Eichung. In der Literatur werden diese negativen Werte bei der Anwendung der Least-Squares Verfahren durch verschiedene Algorithmen kompensiert. Leggett (76) wendete erfolgreich die Simplex-Optimierung auf die multiple Regressionsanalyse an.

Bei der Simplex-Optimierung wird zu der Summe der Abweichungsquadrate

$$F = \sum_{k=1}^m (E_k - \sum_{j=1}^n x_j \varepsilon_{jk})^2 \quad (6.7)$$

$$x = c \cdot d$$

m - Anzahl der Meßstellen

n - Anzahl der Komponenten

F - Zielfunktion

bei negativen Konzentrationen $c_r = x_r$ & ein zusätzlicher Wert zu Zielfunktion addiert.

$$F = \sum_{k=1}^m [(E_k - \sum_{j=1}^n x_j \varepsilon_{jk})^2 + (x_r \varepsilon_{rk})^2] \quad (6.8)$$

mit r - Index für die Komponente j deren berechnete Konzentration negativ ist

Die Zielfunktion wird durch das Auftreten negativer Konzentrationen durch die Straffunktion vergrößert, so daß eine Konvergenz durch die Minimalisierung der Zielfunktion bei negativen Konzentrationen für eine Komponente verhindert

wird. Mit Hilfe dieser Simplex-Optimierung, bei der die Zielfunktion bei negativen Konzentrationen vergrößert wird, wurde von Nagano und Metzler (77) die quantitative Bestimmung eines Mehrkomponentensystems erfolgreich durchgeführt. Die Anwendung auf die Berechnung der Konzentrationen der aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin der Peptide des SCM-Lysozym ist in Abb. 6.8 dargestellt. Durch die Beeinflussung der Zielfunktion wird das Auftreten negativer Konzentrationen unterdrückt. Dieses wird durch Vergleich mit Abb. 6.7 deutlich, zu deren Berechnung die gleiche Ausgangsdatei eingesetzt wurde. Durch Vergleich von drei Chromatogrammen des Peptidgemisches des SCM-Lysozym in Tab. 6.9 zeigt sich, daß die Peptide, die Tyrosin enthalten, in allen drei Chromatogrammen bei gleicher Retentionszeit (im Rahmen der Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten) gefunden werden.

t _R [sec]	m _i [nmol]			
	C 1	C 2	C 3	Mittelwert
674	0.27	0.72	0.42	0.47
1240	0.85	0.92	0.84	0.87
1306	0.58	0.83	0.54	0.65

Tab. 6.9 berechnet Stoffmenge m_i der Tyrosinhaltigen Peptide des Lysozym bei Reproduzierung der Trennung in drei Chromatogrammen (C1,C2,C3)

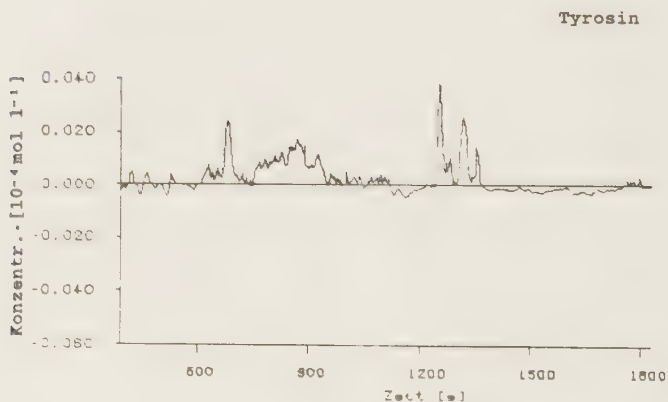
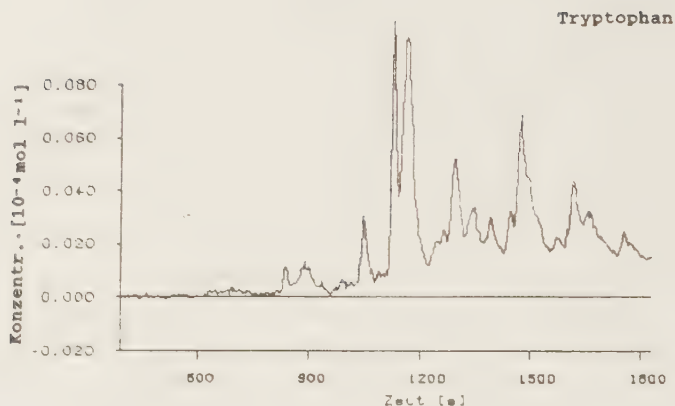


Abb. 6.8 zeitliche Änderung der Konzentration berechnet mit der Simplex-Optimierung - unter besonderer Berücksichtigung der negativen Konzentrationen - aus den Spektren der Trennung der Peptide des Lysozym

Da jedoch die berechneten Konzentrationen (siehe Abb. 6.8) für Tyrosin unterhalb der Nachweisgrenze liegen, kann nur auf Grund der Reproduzierbarkeit der Peaks festgestellt werden, daß das Peptid Tyrosin enthält. Eine quantitative Bestimmung ist nicht möglich.

Ein quantitativer Vergleich der berechneten Stoffmengen für Tryptophan mit der Simplex-Optimierung über alle Spektren des Chromatogramms in Tab. 6.10 mit den Ergebnissen der Mehrkomponentenanalyse (Tab. 6.8) zeigt, daß die Stoffmenge, die für Tryptophan berechnet wurde, kleiner ist als die, die mit der Mehrkomponentenanalyse berechnet wurde, die negative Konzentrationen als Ergebnis zuläßt. An der Stelle der negativen Konzentrationen werden für die jeweils andere

	Chromatogramm			Mittelwert
	1	2	3	
m_1 [nmol]	32.4	38.4	38.5	36.4
m_1 / m_s	4.9	5.8	5.8	5.5
Δm [%]	-18.4	-3.1	-2.2	-8.1

Tab. 6.10 Simplex-Optimierung der Tryptophanhaltigen Peptide

- m_1 - berechnet Stoffmengen aller Tryptophanhaltigen Peptide mit der Simplex-Optimierung,
- n - berechnete Anzahl der Tryptophanreste insgesamt $n = m_1 / m_s$, ($m_s = 6.6$ nmol)
- Δm - relative Abweichung der Stoffmenge unter Berücksichtigung der Anzahl der Tryptophanreste

Komponente höhere Konzentrationen bestimmt, da die negativen Werte ausgeglichen werden müssen. Wird das Auftreten von negativen Konzentrationen für Tyrosin unterdrückt, muß die Konzentration von Tryptophan abnehmen, so daß die Stoffmenge insgesamt kleiner wird.

Bei einem komplexen Gemisch, wie es bei den Peptiden des tryptisch verdauten SCM-Lysozym auftritt, ist eine quantitative Bestimmung der einzelnen Peptide auf Grund der Vielzahl der Nebenprodukte, die durch unvollständige und zusätzliche enzymatische Spaltungen entstehen, nicht möglich. Liegt wie im Falle der 3 Peptide in Kap. 6.2 eine definierte Anzahl chromatographische Peaks vor, kann die Anzahl der Tryptophanreste in einem Peptid bestimmt werden.

Schwierigkeiten treten jedoch bei der Auswahl geeigneter Eichsubstanzen auf, da Verschiebungen der Absorptionsspektren der aromatischen Aminosäuren in Peptiden im Vergleich zu den freien Aminosäuren auftreten können. Das Auftreten negativer Konzentrationen ist die Folge. Dieses wird durch die geringe Selektivität des Zweikomponentensystems Tyrosin und Tryptophan verstärkt. Phenylalanin kann auf Grund seiner geringer Empfindlichkeit nicht nachgewiesen werden. Die quantitative Bestimmung des Tryptophan im nmol-Bereich ist jedoch grundsätzlich möglich. Eine Verbesserung der biochemischen Aufbereitung des zu analysieren Proteins sollte hier auch die Möglichkeit des Vergleichs der verschiedenen Peptide - falls diese in gleichen Stoffmengen vorliegen - in Bezug auf die Anzahl ihrer Tryptophanreste ermöglichen.

7. Zusammenfassung

Durch den Einsatz eines Diodenarray-Spektrometers als Detektor für die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie wurde das Eluat in gleichmäßigen Intervallen mit Hilfe eines Mikroprozessors zur Datenerfassung mit 512 Dioden als Detektorelemente spektral erfaßt. Mit Hilfe dieser Vielkanaldetektion wurde die Mehrkomponentenanalyse aromatischer Aminosäuren in Peptiden durchgeführt. Die Anwendbarkeit des Diodenarray-Spektrometers wurde anhand einiger Kerngrößen, die die Analyse beeinflussen können, untersucht. Dazu gehören das Verhalten des Dunkelstroms, die Stabilität der Strahldichteverteilung und der Einfluß der Integrationszeit und der Fehlstrahlung auf den Meßwert.

1. Die Abhängigkeit des Signal-Rausch-Verhältnisses von der Akkumulationsrate mit $\sqrt{n}$ wurde durch die Mittelwertbildung von Dunkelstrommessungen mit unterschiedlicher Scanrate gezeigt. Die beiden Diodenreihen des Arrays zeigen unterschiedliches Warmlaufverhalten, die Drift der Dioden hängt von der Einschaltdauer des Array ab.
2. Die Stabilität der Strahldichteverteilung der zur Analyse benutzten Deuteriumlampe wird über die Standardabweichung ermittelt, die bei Langzeitmessungen 0.4% betrug. Durch die Schwankungen der Intensität der Lichtquelle ändert sich auch die spektrale Zusammensetzung der Strahldichteverteilung. Daher kann eine Korrektur der Schwankungen nur teilweise durch den Vergleich anderer Spektralbereiche erfolgen.
3. Mit verschiedenen Algorithmen wurde das Dunkelstromverhalten für jede einzelne Diode in Abhängigkeit von der Integrationszeit berechnet. Da die Entladung der Speicherkondensatoren durch Dunkelstrom vom Ladungszustand der Kondensatoren abhängt, ist bei höheren

Integrationszeiten eine Dunkelstromkorrektur zur Berechnung des Nutzsignals aus dem gemessenen Signal einer einfachen Subtraktion des gemessenen Dunkelstroms vorzuziehen. Mit der Dunkelstromkorrektur wurde die Linearität der Nutzsignal-Integrationszeit-Beziehung bestätigt. Bei niedrigen Integrationszeiten sind die mit Dunkelstromkorrektur bzw. Dunkelstromsubtraktion berechneten Werte annähernd gleich groß, so daß bei niedrigen Integrationszeiten die einfachere Berechnung des Nutzsignals durch Subtraktion des Dunkelstroms bevorzugt wird.

4. Zur Berechnung des Fehlstrahlungsanteils des Polychromators wurden verschiedene Modelle eingesetzt. Nach der Optimierung der Parameter der verschiedenen Modelle wurde festgestellt, daß das Modell, bei dem der Fehlstrahlungsanteil von der Konzentration der Probe unabhängig ist, mit dem Modell, das eine Konzentrationsabhängigkeit des Fehlstrahlungsanteils berücksichtigt, bei verschiedenen Meßstellen konkurriert. Der Fehlstrahlungsanteil ist wellenlängenabhängig und wird nicht durch die Position des Diodenarrays im Spektralbereich beeinflußt. Im Durchschnitt wurde bei dieser Anordnung 2% Fehlstrahlung bestimmt. Da jedoch auch größere Fehlstrahlungsanteile beobachtet wurden, wurde die maximale Extinktion auf 0.3 begrenzt.
5. Die simultane quantitative Analyse der aromatischen Aminosäuren wurde durch die Unterschiede in den Nachweisgrenzen der Aminosäuren, die um eine Zehnerpotenz variieren, erschwert. Auf Grund der geringen Selektivität des Zweikomponentensystems Tryptophan und Tyrosin wurden bei der Mehrkomponentenanalyse der freien aromatischen Aminosäuren Sollwertabweichungen bis zu 3.5 % gefunden.
6. Peptide mit unterschiedlicher Anzahl aromatischer Aminosäurereste wurden nach der chromatographischen Trennung

im Eluat quantitativ bestimmt. Die Anzahl der Tryptophanreste konnte korrekt bestimmt werden. Dieses wurde bei Peptiden bekannter Zusammensetzung überprüft. Auf Grund der Abweichungen im spektralen Verhalten der gebundenen Aminosäuren zu den freien Aminosäuren traten bei der Tyrosin-Bestimmung bei gleichzeitiger Anwesenheit von Tryptophan Schwierigkeiten auf, die auch auf die geringe Selektivität zurückgeführt wurden. Die quantitative Bestimmung der Peptide des S-Carboxymethylierten Lysozym, die durch enzymatische Spaltung durch Trypsin aus dem Protein gebildet wurden, war auf Grund der Vielzahl der Nebenreaktionen des Enzyms nicht möglich, da die Peptide nicht in stöchiometrischen Verhältnissen gebildet wurden.

8 Literaturverzeichnis

- (1) Y. Talmi, Anal. Chem., 47, 658A, (1975)
- (2) Y. Talmi, Anal. Chem., 47, 699A, (1975)
- (3) D.G. Jones, Anal. Chem., 57, 1057A (1985)
- (4) Y. Talmi, R.W. Simpson, Appl. Opt., 19, 1401, (1980)
- (5) R.K. Winge, V.A. Fassel, D.E. Eckels, Appl. Spectrosc., 40, 461, (1986)
- (6) R.W. Simpson, Rev. Sci. Instrum., 50, 730, (1979)
- (7) R. Jacob, Dissertation Bochum 1981
- (8) Y. Talmi, Appl. Spectrosc., 36, 1, (1982)
- (9) G. Horlick, E.G. Coddling, Anal. Chem., 47, 658, (1975)
- (10) R.E. Dessy, W.D. Reynolds, W.G. Nunn, C.A. Titus, G.F. Moler, Clin. Chem., 22, 1472, (1976)
- (11) Y. Talmi, Multichannel Image Detectors, ACS Symposium Series 102, American Chemical Society, Washington D.C. 1979
- (12) D.F. Marino, J.D. Ingle, Anal. Chem., 53, 645, (1981)
- (13) D.G. Jones, Anal. Chem., 57, 1207A, (1985)
- (14) H. Aryamanya-Mugisha, R.R. Williams, Appl. Spectrosc., 39, 693, (1985)

- (15) T. Okamoto, S. Kawata, S. Minami, *Appl. Spectrosc.*,
40, 691, (1986)
- (16) V. Karanassios, G. Horlick, *Appl. Spectrosc.*,
40, 813, (1986)
- (17) S.A. George, A. Maute, *Chromatographia*, 15, 419, (1982)
- (18) B.F.H. Drenth, R.T. Ghijsen, R.A. de Zeeuw, *J. Chromatogr.*,
238, 113, (1982)
- (19) H. Elgass, A. Maute, R. Martin, S. George, *Labor Praxis*,
256, April 1982
- (20) S. Ebel, A. Werner-Busse, *Fresenius Z. Anal. Chem.*,
318, 235, (1982)
- (21) A.F. Fell, B.J. Clark, H.P. Scott, *J. Chromatogr.*,
297, 203, (1984)
- (22) C.Y. Yang, H.J. Pownall, A.M. Gotto, *Anal. Biochem.*,
145, 67, (1985)
- (23) A.F. Fell, H.P. Scott, R. Gill, A.F. Moffat, *J. Chromatogr.*,
273, 3, (1983)
- (24) M.J. Milano, S. Lam, M. Savonis, D.B. Pautler, J.W. Pav,
E. Grushka, *J. Chromatogr.*, 149, 599, (1978)
- (25) D.T. Rossi, H.L. Pardue, *Anal. Chim. Acta*, 175, 153, (1985)
- (26) D.T. Rossi, D.J. Desilets, H.L. Pardue, *Anal. Chim. Acta.*,
161, 191, (1984)
- (27) M.J. Milano, S. Lam, E. Grushka, *J. Chromatogr.*,
125, 315, (1976)

- (28) M.J. Milano, E. Grushka, J. Chromatogr., 133, 352, (1977)
- (29) Y.R. Tahboub, H.L. Pardue, Anal. Chem., 57, 38, (1985)
- (30) R.F. Lacey, Anal. Chem., 58, 1404, (1986)
- (31) B. Vandeginste, W. Derks, G. Kateman, Anal. Chim. Acta., 173, 253, (1985)
- (32) D.W. Osten, B.R. Kowalski, Anal. Chem., 56, 991, (1984)
- (33) R.E. Dessy, W.G. Nunn, C.A. Titus, W.R. Reynolds, J. Chromatogr. Sci., 14, 195, (1976)
- (34) R.E. Dessy, W.D. Reynolds, W.G. Nunn, C.A. Titus, G.F. Moler, J. Chromatogr., 126, 347, (1976)
- (35) B. Grego, E.C. Nice, R.J. Simpson, J. Chromatogr., 352, 359, (1986)
- (36) DMS UV-Atlas organischer Verbindungen, Verlag Chemie Weinheim 1966
- (37) Handbook of Biochemistry, Selected Data for Molecular Biology, 2nd Ed., The Chemical Rubber Co. Cleveland, Ohio, 1970
- (38) H. Dannenberg, Angew. Chem., 63, 208, (1951)
- (39) D.B. Wetlaufer, Advanc. Protein. Chem., 17, 303, (1962)
- (40) H. Edelhoch, Biochemistry, 6, 1948, (1967)
- (41) J.W. Donovan, in S.J. Leach (editor) "Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry", Part A, S.101, Academic Press, New York 1969

- (42) T. Ichikawa, H. Terada, *Biochim. Acta*, 580, 120, (1979)
- (43) C. Balestrieri, G. Colonna, A. Giovane, G. Irace,
L. Servillo, *Eur. J. Biochem.*, 90, 433, (1978)
- (44) R.L. Levine, M.M. Federici, *Biochemistry*, 21, 2600, (1982)
- (45) J. Chrastil, *Anal. Biochem.*, 158, 443, (1986)
- (46) R.L. Levine, S.R. Lehrman, *J. Chromatogr.*, 288, 111, (1984)
- (47) A. Dabre, "Practical Protein Chemistry - A Handbook",
John Wiley & Sons Ltd. 1986
- (48) R.L. Heinrikson, S.C. Meredith, *Anal. Biochem.*,
136, 65, (1984)
- (49) I. Molnar, C. Horvath, *J. Chromatogr.*, 142, 623, (1977)
- (50) I. Molnar, M. Schoeneshoefer, *High Performance Liquid
Chromatographie in Protein and Peptide Chemistry*,
editors F. Lottspeich, A. Henschen, K.-P. Hupe,
Walter de Gruyter Berlin New York 1981
- (51) H. Engelhardt, *Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie*,
2.Auflage, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 1977
- (52) G. Winkler, P. Wolschann, P. Briza, F.X. Heinz, C. Kunz,
J. Chromatogr., 347, 83, (1985)
- (53) J.E. Rivier, *J. Liq. Chromatogr.*, 1, 343, (1978)
- (54) T. Sasagawa, K. Titani, K.A. Walsh, *Anal. Biochem.*,
134, 224, (1983)
- (55) S. Tanaka, N. Mohri, H. Kihara, M. Ohno, *J. Biochem.*,
97, 1377, (1985)

- (56) L. Haeffner-Gormley, N.H. Poludniak, D.B. Wetlaufer,
J. Chromatogr., 214, 185, (1981)
- (57) M.D. Waterfield, G.T. Scarce, Biological and Biomedical
Applications of Liquid Chromatography, 3,
G. Hawk editor, New York: M. Dekker 1981
- (58) A.P. Goldberg, E.L. Nowakowska, M.A. Quarry,
M.A. Stadalius, Labo, 962, August 1985
- (59) H.J. Streckert, Dissertation Bochum 1982
- (60) M. Beiske, Diplomarbeit Bochum 1982
- (61) T. Linke, Dissertation Bochum 1981
- (62) U. Hoffmann, H. Hoffmann, Einführung in die Optimierung,
Verlag Chemie Weinheim 1971
- (63) J.A. Nelder, R. Mead, Computer J., 7, 308, (1965)
- (64) M. Wiecken, Dissertation Bochum 1982
- (65) L. Sachs, Angewandte Statistik, Springer Verlag
Berlin Heidelberg New York 1978
- (66) P. Zinn, Dissertation Bochum 1979
- (67) B. von Oepen, Diplomarbeit Bochum 1986
- (68) R. Zurmühl, Matritzen, 3. Auflage, Springer Verlag
Berlin Göttingen Heidelberg 1961
- (69) B. Hoppe, J. Martens, Chemie in unserer Zeit,
17, 41, (1983)

- (70) A.L. Lehninger, Biochemie, 2.Auflage, Verlag Chemie
Weinheim New York 1977
- (71) L. Stryer, Biochemie, 3.Auflage, Friedr. Vieweg & Sohn,
Braunschweig/Wiesbaden 1985
- (72) A.M. Crestfield, S. Moore, W.H. Stein, J. Biol. Chem.,
238, 622, (1963)
- (73) R.E. Canfield, J. Biol. Chem., 238, 2691, (1963)
- (74) M. Noda et. al., Nature, 312, 121, (1984)
- (75) J.C. Sternberg, H.S. Stillo, R.H. Schwendeman,
Anal. Chem., 32, 84, (1960)
- (76) D.J. Leggett, Anal. Chem. 49, 276, (1977)
- (77) K. Nagano, D.E. Metzler, J. Amer. Chem. Soc.,
89, 2891, (1967)

Anhang

A1 Die Mehrkomponentenanalyse

Durch das Bouguer-Lambert-Beersche Gesetz wird der Zusammenhang von Absorption A als Meßwert und Konzentration c als Meßgröße beschrieben.

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d = -\lg \frac{I}{I_0} \quad (A1)$$

A - Absorption (nach DIN-Bezeichnung:
spektrales dekadisches Absorptionsmaß)

ϵ - molarer dekadischer Absorptionskoeffizient (früher Extinktionskoeffizient)
[l mol⁻¹ cm⁻¹]

d - Schichtdicke [cm]

I₀ - Intensität des eingestrahltten Lichts

I - geschwächte Intensität durch die Probe

Abweichungen von dieser Proportionalitätsbeziehung können durch Wechselwirkungen zwischen den gelösten Teilchen, durch fluoreszierende Lösungen, nicht hinreichend monochromatische Strahlung und Fehlstrahlungseinflüsse hervorgerufen werden. Wenn keine dieser Einflüsse berücksichtigt werden müssen, kann das spektrale dekadische Absorptionsmaß ϵ als Stoffkonstante durch eine Kalibrierung bestimmt werden. Die Schichtdicke d der Küvette ist konstant.

Bei Einkomponentensystemen kann die Konzentration durch Umkehrung der Gl. A1 berechnet werden. Auf Grund der Additivität der Extinktionen setzt sich die Extinktion eines Mehrkomponentensystems bei einem Meßpunkt i aus den Einzelextinktionen zusammen.

$$A_i = \sum_{j=1}^n \varepsilon_{ij} \cdot c_j \cdot d \quad (A2)$$

n - Komponentenanzahl

Um die Konzentration der einzelnen Komponenten zu bestimmen, müssen mindestens $m=n$ Meßpunkte vorhanden sein, so daß m Gleichungen mit n Unbekannten (c) gelöst werden können. Das lineare Gleichungssystem kann dann in Matrizenschreibweise ausgedrückt werden.

$$\begin{pmatrix} A_1 \\ A_2 \\ \vdots \\ A_m \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \varepsilon_{11} & \varepsilon_{12} & \dots & \dots & \dots & \varepsilon_{1n} \\ \varepsilon_{21} & \varepsilon_{22} & \dots & \dots & \dots & \vdots \\ \vdots & \vdots & \ddots & \ddots & \ddots & \vdots \\ \varepsilon_{m1} & \varepsilon_{m2} & \dots & \dots & \dots & \varepsilon_{mn} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} c_1 \\ c_2 \\ \vdots \\ c_n \end{pmatrix} \cdot d \quad (A4)$$

oder

$$\underline{A}(m) = \underline{\varepsilon}(m,n) \cdot \underline{c}(n) \cdot d \quad (A5)$$

$\underline{A}$ - Extinktionsvektor

$\underline{\varepsilon}$ - Koeffizientenmatrix

$\underline{c}$ - Konzentrationsvektor

Bei einer Überbestimmung des Systems ($m > n$) kann nach der Methode der kleinsten Fehlerquadratsumme ein Fehlerausgleich durchgeführt werden. Bei der Auflösung von Gl. A4 nach dem Konzentrationsvektor muß bei einer nicht quadratischen Koeffizientenmatrix durch Linksmultiplikation mit der Transponierten eine quadratische Matrix $\varepsilon^T \cdot \varepsilon$ erzeugt werden (Gaußtransformierte).

$$\underline{\varepsilon}^T(n,m) \cdot \underline{A}(m) = \underline{\varepsilon}^T(n,m) \cdot \underline{\varepsilon}(m,n) \cdot \underline{c}(n) \cdot d \quad (A5)$$

Durch Inversion der Gaußtransformierten $(\varepsilon^T(n,m) \cdot \varepsilon(m,n))^{-1}$ (Kovarianzmatrix) kann die Gleichung nach $c(n)$ aufgelöst werden.

$$\underline{c}(n) = [\underline{\varepsilon}^T(n,m) \cdot \underline{\varepsilon}(m,n)]^{-1} \cdot \underline{\varepsilon}^T(n,m) \cdot \underline{A}(m) \cdot d \quad (A6)$$

Das Produkt $(\varepsilon^T \cdot \varepsilon)^{-1} \cdot \varepsilon^T$ wird als Linksinverse bezeichnet. Die Grundlagen der Matrizenoperationen sind z.B. von Zurmühl (68) beschrieben.

Die quantitative Analyse von Spektren wird nach der Gleichung (A6) in dem Programm ANNK26 durchgeführt. Bis zu 4 Komponenten können mit einem anzugebenden Auswertebereich bestimmt werden, so daß auch nur Teilbereiche des Spektrums zur Analyse verwendet werden können. Durch die separate Speicherung der Konzentrationen und der Summenkonzentrationen für jede einzelne Komponente kann nach der Analyse die zeitliche Änderung der Konzentration für jede der Komponenten dargestellt werden.

A2 Übersicht über die verwendeten Programme

Im folgenden wir eine Übersicht über die verwendeten Programme zur Auswertung und Darstellung der Meßwerte gegeben.

Auswertung:

- | | |
|--|--------|
| 1. Berechnung der Extinktionen des Chromatogramms mit Hilfe von Referenzspektren | EXDI26 |
| 2. Berechnung der Extinktionskoeffizienten durch eine Ausgleichsrechnung über eine Konzentrationsreihe | EISI26 |
| 3. Mehrkomponentenanalyse mit Hilfe der Ergebnisse aus 1 und 2 | ANNK26 |
| 4. Berechnung der Konzentrationen mit Hilfe der Simplex-Optimierung mit den Ergebnissen aus 1 und 2 | SIMP26 |

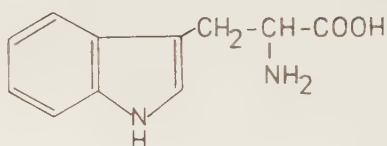
Darstellung:

- | | |
|---|--------|
| 5. von zweidimensionalen Chromatogrammen | DVPL26 |
| 6. von dreidimensionalen Chromatogrammen | PLOT26 |
| 7. von Konzentrationsprofilen
Ergebnisse aus 3 und 4 | DLPL26 |

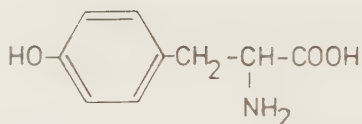
Diese Programme sind am Lehrstuhl für Analytische Chemie, Ruhr-Universität Bochum verfügbar.

A3 Strukturformel einiger Aminosäuren

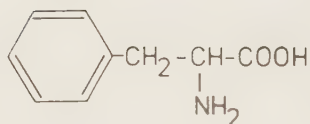
Tryptophan



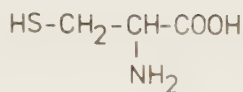
Tyrosin



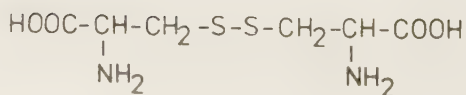
Phenylalanin



Cystein



Cystin



A4 Peptide nach der Spaltung der Disulfidbrücken und enzymatischen Spaltung

Nr.	Nr. der Aminosäure	Aminosäuresequenz der Peptide
1	1	K
2	2 - 5	VFGR
3	6 - 13	CELAAAMK
4	14	R
5	15 - 21	HGLDNYR
6	22 - 33	GYS LGNWVCAAK
7	34 - 45	FESNFNTQATNR
8	46 - 61	NTDGSTDYGILQINSR
9	62 - 68	WWCNDGR
10	69 - 73	TPGSR
11	74 - 96	NLCNIPCSALLSSDITASVNC AK
12	97	K
13	98 - 112	IVSDGDGMNAWVAWR
14	113 - 114	NR
15	115 - 116	CK
16	117 - 125	GTDVQAWIR
17	126 - 128	GCR
18	129	L

Tab. A1 Peptide des Lysozym nach der Spaltung der Disulfidbrücken und der tryptischen Verdauung, Nummer der Aminosäuren entsprechend der Sequenz im Lysozym-Molekül
(Erklärung der Abkürzungen der Aminosäuren in Tab. 6.4)

A5 Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

a	- auf den Zeitpunkt $t=0$ extrapolierte Größe der Restentladung der Kondensatoren
A,B,BA	- Fehlstrahlungsanteile
b_{100}	- Hunderstelwertbreite des Nutzsignals
c	- Konzentration
C_{NWG}	- Nachweisgrenze
d	- Schichtdicke
E	- Extinktion (Absorption)
E'	- scheinbare Extinktion
f	- Freiheitsgrade
F	- Prüfgröße für den F-Fest
Fi	- Fibonacci-Zahl
I	- durch die Probe geschwächte Intensität
I_0	- Intensität des eingestrahltten Lichts
I_f	- Intensität der Fehlstrahlung
m_1	- berechnete Stoffmenge
m_s	- Sollwert der Stoffmenge
Δm	- relative Sollwertabweichung
n	- berechnet Anzahl der Aminosäurereste
p	- Fehlstrahlungsanteil
Q	- Ladung des Kondensators
R	- Reststreuung
s	- Schätzwert der Standardabweichung
$s_{y \cdot x}$	- Reststreuung durch Regression von y auf x ermittelt
S_d	- Signalgröße des Dunkelstroms
S_{ges}	- Gesamtsignal ($S_N + S_d$)
S_N	- Nutzsignal
S_0	- Signalgröße des Dunkelstroms bei unendlicher Integrationszeit
t	- Prüfgröße für den t-Test
t_R	- Gesamtretentionszeit
T	- Reintransmissionsgrad
T'	- scheinbare Transmission
V_s	- Volumen der aufgegebenen Probenlösung

ε	- spektrales dekadisches Absorptionsmaß
θ	- Selektivität
λ	- Wellenlänge
$\Phi(\lambda)$	- effektive spektrale Gerätefunktion
σ	- Standardabweichung
$\Sigma \delta_i^2$	- Summe der Abweichungsquadrate
τ	- Zeitkonstante

Lebenslauf

26.01.1958	Geboren in Bochum als Tochter der Eheleute Heinrich und Henriette Beiske
1964 - 1967	Besuch der Volksschule (Hiltroperschule)
1967 - 1976	Besuch des Freiherr-vom-Stein Gymnasiums in Bochum
22.06.1976	Abitur
1976 - 1982	Chemiestudium an der Ruhr-Universität Bochum 1978 Diplomvorprüfung 1981-1982 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Analytische Chemie der Ruhr-Universität Bochum mit dem Thema "Analyse partiell getrennter HPLC-Fraktionen mit einem Diodenarray-Spektrometer" 1982 Diplomhauptprüfung
Sep. 1982	Beginn der Doktorarbeit am Lehrstuhl für Analytische Chemie der Ruhr-Universität Bochum
16.09.1982	Eheschließung mit Heinz-Günter Wiedemann



